

Журнал основан в 1918 г.

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

Научный журнал

Серия “Биология, химия”

Том 25 (64). № 3

Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского

Симферополь, 2012

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. Подсолонко В. А. – д.э.н. проф. |
| 3. Вахрушев Б.А. – д.г.н., проф. | 9. Ротань В.Г. – д.ю.н., проф. |
| 4. Гришковец В.И. – д.х.н., проф. | 10. Темурьянц Н.А. – д.б.н., проф. |
| 5. Казарин В.П. – д.филол.н., проф. | 11. Шоркин А.Д. – д.филос.н., проф. |
| 6. Климчук С.В. – д.э.н., доц. | 12. Юрченко С.В. – д.полит.н., проф. |

Редакционная коллегия серии «Биология, химия»:

Раздел «Биология»:

- 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.
Павленко В.Б. – д.б.н., проф.
Темурьянц Н.А. – д.б.н., проф., (редактор
серии, редактор раздела «Биология»),
(timur328@gmail.com)
Чуян Е.Н. – д.б.н., проф.
Юрахно М. В. – д.б.н., проф.

Раздел «Химия»:

- Гришковец В.И. – д.х.н., проф., (редактор
раздела «Химия»), (physchem@crimea.edu)
Земляков А. Е. – д.х.н., проф.
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 № 9 от 27.09.2012 г.**

Подписано в печать 12.10.2012 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 університета ім. В.І. Вернадського»

Науковий журнал. Том 25 (64), №3, Біологія, хімія.
Сімферополь, Таврійський національний університет ім. В.І.Вернадського, 2012
Журнал заснований у 1918 р.
Адреса редакції: пр. Вернадского, 4, м. Сімферополь, 95007
Надруковано у інформаційно-видавницькому відділі Таврійського національного університету
ім. В.І. Вернадського, пр. Вернадського, 4, м. Сімферополь, 95007
http://science.crimea.edu/zapiski/zapis_god.html

БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

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

Серия «Биология, химия». Том 25 (64). 2012. № 3. С. 3-10.

УДК 612.822.3.08; 612.821.2

ВЛИЯНИЕ КУРСА СЕАНСОВ НЕЙРОТЕРАПИИ НА ХАРАКТЕРИСТИКИ ВЫЗВАННЫХ ПОТЕНЦИАЛОВ ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ

Алиева Т.А., Эйсмонт Е.В., Павленко В.Б.

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

Изучали влияние курса сеансов нейротерапии на характеристики паттерна вызванных ЭЭГ-потенциалов, зарегистрированных с помощью модификации двустимульной Go/No-Go парадигмы у 33 детей и подростков 6-14 лет. Получены данные, свидетельствующие о том, что в результате прохождения курса сеансов обратной связи по характеристикам электроэнцефалограммы, временные характеристики вызванных потенциалов претерпевают изменения. Было отмечено уменьшение значений латентного периода компонентов Р1 и Р2. Кроме того, сеансы нейротерапии благоприятно влияют на индивидуальные психо-эмоциональные характеристики личности, о чем свидетельствует обнаруженное уменьшение уровней «магической» и общей тревожности по шкале личностной тревожности учащихся А. М. Прихожан, а также уменьшение показателя «трудности общения» по проективной методике «Дом – Дерево – Человек».

Ключевые слова: вызванные потенциалы, обратная связь по характеристикам ЭЭГ, дети, подростки.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время общеизвестным является факт зависимости параметров вызванных потенциалов (ВП) от индивидуальных паттернов переработки информации и характеристик личности. Так, имеются работы, свидетельствующие о существовании связи между характеристиками ВП и уровнем тревожности, внимания и других когнитивных функций [1, 2]. В то же время, на параметры ВП могут оказывать влияние и другие факторы внешней и внутренней среды. Поскольку на сегодняшний день одним из самых распространенных методов влияния на электрическую активность мозга является метод биологической обратной связи по электроэнцефалограмме (ЭЭГ-ОС, нейрофидбек), актуальным становится вопрос, ограничивается ли влияние данного метода только характеристиками электроэнцефалограммы, или же оно распространяется и на другие виды электрической активности мозга, в частности на параметры ВП. Соответственно этому, целью настоящего исследования было изучение изменений в характеристиках ВП после курса тренингов ЭЭГ-ОС, направленных на снижение тревожности у детей и подростков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие 33 практически здоровых ребенка 6-14 лет (20 мальчиков и 13 девочек). Дети были разделены на две группы: экспериментальную ($n = 16$) и контрольную ($n = 17$). Тренинг, в котором участвовали дети из экспериментальной группы, включал 10-12 сеансов, занятия проводились два раза в неделю. Во время сеансов испытуемый располагался в удобном кресле перед экраном монитора компьютера. Сеанс включал в себя несколько (пять-семь) эпизодов записей различных вариантов акустической и визуальной обратной связи (ОС), чередующихся между собой. В качестве тренируемого показателя были выбраны спектральная плотность мощности альфа-ритма и соотношение спектральных плотностей мощности альфа- и тета-ритмов. Подробное описание методики и принципов расчета показателей спектральной плотности мощности ритмов ЭЭГ было приведено ранее [3, 4].

До и после окончания тренинга у испытуемых регистрировали вызванные потенциалы в двустимульной Go/No-Go парадигме. У испытуемых контрольной группы двукратная регистрация ВП проходила с интервалом, соответствующим продолжительности проведения тренинга у детей экспериментальной группы.

В рамках Go/No-Go парадигмы испытуемым предъявляли 30 пар акустических стимулов – тональных посылок различной частоты с интервалами по 2 с внутри пары и по 4 с между парами. Пары акустических стимулов предъявлялись в случайном порядке с одинаковой (приближающейся к 50%) вероятностью появления как высокого, так и низкого тона. Задача, которая ставилась перед испытуемыми, заключалась в нажатии на кнопку ведущей рукой в ответ на предъявление второго стимула в паре, которая состояла из двух стимулов одинаковой частоты – высокой или низкой. Время реакции должно было не превышать эталонного значения. В то же время испытуемым предлагалось не реагировать на пары стимулов, имеющих разную тональность. Первоначально эталонное время устанавливали равным 500 мс для испытуемых 6–9 лет, и 380 мс для испытуемых 10–16 лет. В дальнейшем после первой и всех последующих реакций испытуемого эталонное время рассчитывалось как медиана всех имеющихся на данный момент значений времени сенсомоторной реакции испытуемого. Таким образом, эталонное время было индивидуальным, поскольку представляло собой величину, рассчитанную отдельно для каждого испытуемого, и оно менялось в процессе выполнения задачи. Обоснование данного подхода при определении эталонного значения времени сенсомоторной реакции описано ранее [1]. После каждого нажатия на кнопку рассчитанное значение эталонного времени реакции сопоставлялось с текущей величиной времени реакции испытуемого. Если данная величина была меньше или равнялась эталонному значению, то задача считалась выполненной успешно; в противном случае констатировалась неуспешность. Испытуемый получал визуальный сигнал обратной связи, информирующий об успешном или неуспешном выполнении задания (предъявлялась соответственно вертикальная или горизонтальная черта на световом табло).

Регистрация ВП осуществлялась с использованием общепринятой методики с помощью автоматизированного комплекса, состоящего из электроэнцефалографа, лабораторного интерфейса и персонального компьютера. Рабочей программой была

«ERP-2» (программист В. В. Арбатов). ЭЭГ-потенциалы отводили монопорлярно в точках F3, F4, T3, T4, C3, C4, P3, P4, O1 и O2, согласно международной системе 10-20. Референтными электродами служили объединенные контакты над сосцевидными отростками черепа.

Волны P1, N1, P2, N1-P2 (вертекс-потенциал) и N2, рассматриваемые как длиннолатентные компоненты экзогенных акустических ВП, регистрировали в случае предъявления всех предупредительных (первых в паре) сигналов, потенциал P300 – при предъявлении всех зрительных сигналов обратной связи. Также регистрировали УНВ, возникающую в интервале между предъявлениеми двух стимулов (предупредительного и императивного) и отражающую процессы подготовки поведенческого акта. Максимумы анализируемых компонентов ВП соответствовали следующим временным интервалам: P1 – 50–100, N1 – 100–150, P2 – 150–250, N2 – 200–300 и P300 – 250–500 мс после предъявления сигналов. За значения латентных периодов компонентов принимали величину временного интервала от начала предъявления стимула до максимума амплитуды соответствующего компонента. Остальные подробности регистрации и расчета характеристик ВП были описаны ранее [2].

Уровень тревожности у детей и подростков определяли с помощью проективной методики «Дом – Дерево – Человек» [5], шкалы явной тревожности А. М. Прихожан и шкалы личностной тревожности учащихся А. М. Прихожан, позволяющей оценить уровни различных видов тревожности (школьной, самооценочной, межличностной, «магической» и общей) [6].

При обработке полученных данных для каждой из групп высчитывалась величина, представляющая собой разницу между значениями параметров ВП во время первой и второй регистрации. Соответствующая величина рассчитывалась также и для показателей психологического тестирования. После этого полученные для контрольной и экспериментальной групп величины подвергались обработке посредством стандартных методов вариационной статистики. Соответствие полученных результатов закону нормального распределения устанавливалось с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Для определения достоверности различий между группами применяли критерий Манна-Уитни. При этом для N1, N2 и УНВ максимальными по амплитуде считали наиболее негативные потенциалы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате анализа полученных данных были отмечены изменения латентных периодов (ЛП) вызванных потенциалов в результате прохождения курса тренингов ЭЭГ-ОС, направленных на снижение тревожности. Данные различия касались преимущественно экзогенных компонентов ВП. Так, для экспериментальной группы было отмечено уменьшение ЛП потенциала P1. Статистически значимые ($p < 0,05$) изменения величины ЛП данного компонента в результате прохождения сеансов нейротерапии были установлены для потенциалов, зарегистрированных от теменных областей обоих полушарий (рис.1). Кроме того, у испытуемых экспериментальной группы также отмечалось значимое уменьшение латентного периода компонента P2 в центральном отведении правого полушария. В то же

время, в контрольной группе значимых изменений амплитудно-временных характеристик ВП не наблюдалось. Это дает основание утверждать, что отмеченные нами изменения характеристик ВП экспериментальной группы напрямую обусловлены участием испытуемых этой группы в курсе сеансов нейротерапии.

Необходимо отметить, что наблюдаемые нами изменения носят вполне закономерный характер, учитывая сложившиеся в литературе представления о роли соответствующих потенциалов. Так, в многочисленных исследованиях была показана существенная связь компонента Р1 с вниманием (см. обзор [7]). Данный потенциал традиционно связывают с подавлением незначимых сигналов и интенсификацией восприятия, происходящей при привлечении внимания к стимулу [8, 9]. Имеются сведения о том, что ЛП данного потенциала обратно пропорционально коррелирует с селективным вниманием [2], и прямо пропорционально – с уровнем тревожности, характерной для индивидуума [1].

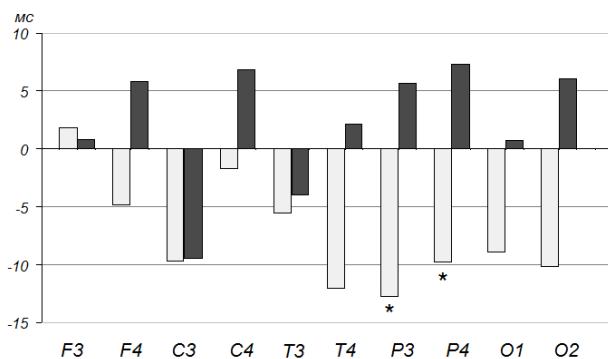


Рис.1. Диаграммы изменений средних значений латентного периода компонента Р1, зарегистрированных у экспериментальной (светлые столбики) и контрольной (темные столбики) групп.

Звездочками отмечены случаи значимых отличий величин латентного периода компонента Р1 между испытуемыми обеих групп (* – $p < 0.05$). F3, F4, C3, C4, T3, T4, P3, P4, O1 и O2 – локусы отведения ЭЭГ-потенциалов согласно системе 10-20. По вертикали – величина изменения латентного периода вызванных потенциалов (мс).

Компонент Р2 также связывают с характеристиками селективного внимания, с которыми его ЛП находится в обратно пропорциональной зависимости. Кроме того, имеются данные, согласно которым ЛП Р2- и N2-колебаний на протяжении детства стремительно уменьшаются до своего минимума в 16 лет, в то время как у взрослых они, постепенно увеличиваются в процессе старения [10]. Соответственно этому, принято считать, что уменьшение ЛП данных ВП является благоприятным признаком, отражающим лучшее развитие когнитивных систем мозга и более высокий уровень внимания.

В тоже время, как уже упоминалось выше, феномен тревожности также находит свое отражение в паттерне рассматриваемых потенциалов. В литературе имеются данные, согласно которым для детей с нарушенной функцией внимания характерна

повышенная тревожность. Так, отмечается наличие тревожных расстройств у детей, страдающих синдромом дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ) [11]. Соответственно, зачастую действия, направленные на изменение уровня тревожности влекут за собой изменение параметров внимания. Так, Чутко Л.С. с соавт. отмечают, что после курса ЭЭГ-ОС (в частности альфа-тренинга) клиническое улучшение наступило у 60% детей с СДВГ [12]. В нашем случае, отмеченные различия между контрольной и экспериментальной группами свидетельствуют об оптимизации работы головного мозга, наблюдалась в результате прохождения курса тренингов ЭЭГ-ОС, и в частности – о снижении уровня тревожности детей и подростков.

Снижение уровня тревожности в результате прохождения курса сеансов нейротерапии подтверждается результатами психологического тестирования. Так, у испытуемых экспериментальной группы было отмечено снижение уровня явной тревожности. Помимо этого, уменьшение уровня личностной тревожности отмечалось также по шкалам школьной, самооценочной, межличностной, «магической» и общей тревожности, определяемых при помощи теста личностной тревожности учащихся А. М. Прихожан. У испытуемых второй группы рассматриваемые показатели, напротив, возрастили. Различия показателей, рассчитываемых по шкалам «магической» и общей тревожности для экспериментальной и контрольной групп, при этом достигли значимого уровня (рис. 2).

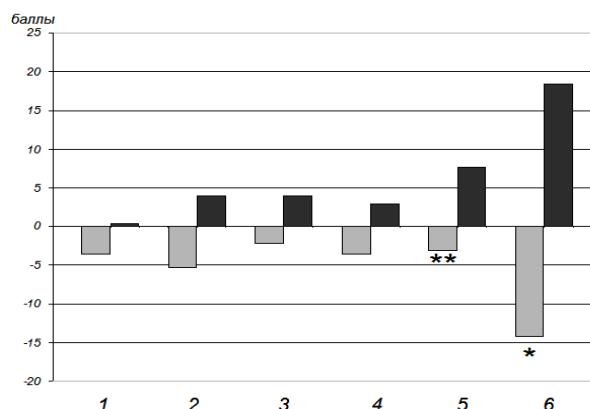


Рис.2. Диаграммы изменений уровня тревожности по шкалам явной и личностной тревожности А.М. Прихожан у испытуемых экспериментальной (светлые столбики) и контрольной (темные столбики) групп.

Звездочками отмечены случаи значимых отличий результатов теста между испытуемыми обеих групп (* – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$). Цифрами обозначены шкалы: 1 – явной тревожности; 2 – школьной тревожности; 3 – самооценочной тревожности; 4 – межличностной тревожности; 5 – «магической» тревожности; 6 – общей тревожности. По вертикали – величина изменения результатов тестирования (баллы).

Результаты проективной методики «Дом – Дерево – Человек» также свидетельствуют об улучшении психо-эмоционального состояния испытуемых, участвовавших в сеансах ЭЭГ-ОС. Наиболее ярко разница между двумя группами проявлялась в отношении такого параметра, как «трудности общения» (рис.3). Следует обратить внимание на то, что результаты испытуемых из контрольной группы по тесту «Дом – Дерево – Человек», подобно результатам предыдущих двух методик, демонстрировали тенденцию к увеличению уровня тревожности. При этом все рассматриваемые показатели, регистрируемые у экспериментальной группы, напротив, уменьшались.

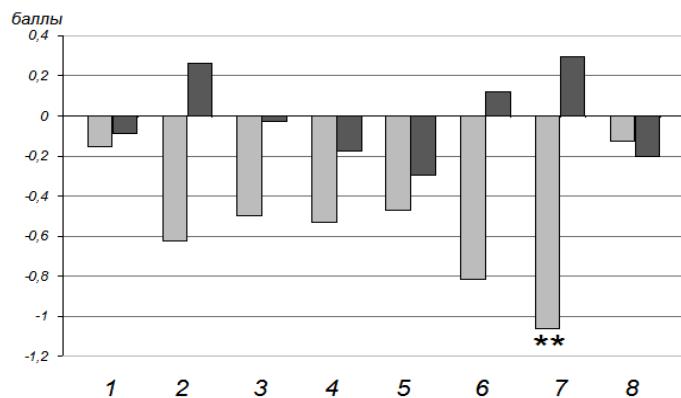


Рис.3. Диаграммы изменений результатов (показателей, получаемых с помощью) проективной методики «Дом – Дерево – Человек» у испытуемых экспериментальной (светлые столбики) и контрольной (темные столбики) групп.

Звездочками отмечены случаи значимых отличий результатов теста между испытуемыми обеих групп (** – $p < 0.01$). Цифрами обозначены шкалы: 1 – незащищенность; 2 – тревожность; 3 – недоверие к себе; 4 – чувство неполноценности; 5 – враждебность; 6 – конфликтность; 7 – трудности общения; 8 – депрессивность. По вертикали – величина изменения результатов тестирования (баллы).

Таким образом, проанализировав полученные результаты, можно заключить, что многократные сеансы ЭЭГ-ОС, направленные на увеличение спектральной плотности мощности альфа-ритма и соотношения спектральных плотностей мощности альфа- и тета-ритма, приводят к снижению уровня тревожности испытуемых, что отражается в результатах соответствующих психологических методик. Кроме того, данный вид нейротерапии приводит к изменениям характеристик ВП. Поскольку параметры ВП являются устойчивыми для индивидуума показателями, для их изменения действующий фактор должен быть достаточно весомым. Соответственно, на основании полученных результатов, можно сделать вывод, что ЭЭГ-ОС является эффективным методом при коррекции тревожности у детей и подростков и может успешно применяться на практике.

ВЫВОДЫ

1. В результате проведения курса сеансов ЭЭГ-ОС, направленных на снижение уровня тревожности, отмечались изменения параметров вызванных ЭЭГ-потенциалов. Латентные периоды потенциалов Р1 и Р2 обнаружили тенденцию к уменьшению своих значений. Данное уменьшение достигает значимых величин в теменных областях обоих полушарий (потенциал Р1) и центральном отведении правого полушария (потенциал Р2). Данные изменения свидетельствуют об улучшении функции внимания и снижении уровня тревожности индивидуумов, участвовавших в сеансах ЭЭГ-ОС.
2. Положительное влияние курса сеансов нейротерапии подтверждается результатами психологического тестирования. У испытуемых экспериментальной группы наблюдалось снижение уровней общей и «магической» тревожности, определяемых при помощи шкалы личностной тревожности учащихся А.М. Прихожан, в то время как для детей из контрольной группы был характерен рост данных показателей.
3. Испытуемые, прошедшие курс сеансов ЭЭГ-ОС, характеризовались достоверно меньшими значениями показателя «трудности общения», определяемого при помощи проективной методики «Дом – Дерево – Человек» по сравнению со значениями аналогичного показателя у испытуемых контрольной группы.
4. Проведение курса сеансов нейротерапии благоприятно влияет на паттерн вызванной электрической активности головного мозга, что отражается в улучшении общего психо-эмоционального состояния детей и подростков.

Список литературы

1. Эйсмонт Е. В. Отражение тревожности в характеристиках вызванных ЭЭГ-потенциалов у детей 10–11 лет / Е. В. Эйсмонт, Н. В. Луцюк, В. Б. Павленко // Нейрофизиология/Neurophysiology. – 2009. – Т. 41, № 6. – С. 513-521.
2. Луцюк Н. В. Связь характеристик вызванных ЭЭГ-потенциалов, зарегистрированных в условиях парадигмы go/no-go, с показателями внимания детей / Н. В. Луцюк, Е. В. Эйсмонт, В. Б. Павленко // Нейрофизиология/Neurophysiology. – 2005. – Т. 37, № 5/6. – С. 452-458.
3. Коррекция тревожности у детей и подростков с помощью курса сеансов обратной связи по характеристикам электроэнцефалограммы / Е.В. Эйсмонт, Т.А. Алиева, Н.В. Луцюк [и др.] // Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2009. – Т. 22 (61), № 4. – С. 286-294.
4. Эйсмонт Е. В. Снижение повышенной тревожности у детей и подростков с помощью нейротерапии: оценка эффективности / Е. В. Эйсмонт, Н. В. Луцюк, В. Б. Павленко // Нейрофизиология/Neurophysiology. – 2011.—Т. 43, № 1. – С. 63-72.
5. Беляускайте Р. Рисуночные пробы как средство диагностики развития личности ребенка / Р. Беляускайте // Диагностическая и коррекционная работа школьного психолога. – Москва, 1987. – С. 67–74.
6. Прихожан А.М. Психология сиротства / А.М. Прихожан, Н.Н. Толстых. – СПб.: Питер, 2005. – 400
7. Коваленко А.А. Эмоциональная значимость стимула и черты личности: отражение в паттерне вызванных ЭЭГ-потенциалов / А.А. Коваленко, В.Б. Павленко // Нейрофизиология/Neurophysiology. – 2009. – Т. 41, № 4. – С. 336-356.
8. Luck S.J. Multiple mechanisms of visual-spatial attention: recent evidence from human electrophysiology / S.J. Luck // Behav Brain Res. – 1995. – V.71, Nos. 1/2. – P. 113-123.

9. Faster, more intense! The relation between electrophysiological reflections of attentional orienting, sensory gain control, and speed of responding / D. Talsma, M. Mulckhuyse, H.A. Slagter [et al.] // Brain Res. – 2007. – № 1178. – P. 97-105.
10. Age-related variations in evoked potentials to auditory stimuli in normal human subjects / D. S. Goodin, K. S. Squires, B. H. Henderson [et al.] // Electroenceph. clin. Neurophysiol. – 1978. – V. 44. – P. 447–458.
11. Anxiety and depressive disorders in attention deficit disorder with hyperactivity: new findings / Jensen P.S., Shervette R.E., Xenakis S.N. [et al.] // Am J Psychiatry. – 1993. – V.8, № 150. – P. 1203-1209.
12. Чутко Л.С. Школьная дезадаптация в клинической практике детского невролога / Чутко Л.С. – СПб. : ИПК БИОНТ, 2006. – 56 с.

Алієва Т.А. Вплив курсу сеансів нейротерапії на характеристики викликаних потенціалів дітей та підлітків / Т.А. Алієва, Е.В. Ейсмонт, В.Б. Павленко // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2012. – Т. 25 (64), № 3. – С. 3-10.

Вивчали вплив курсу сеансів нейротерапії на характеристики патерну викликаних ЕЕГ-потенціалів, зареєстрованих за допомогою модифікації двустімультої Go / No-Go парадигми у 33 дітей і підлітків 6-14 років. Отримані дані свідчать про те, що в результаті проходження курсу сеансів зворотного зв'язку за характеристиками електроенцефалограми, тимчасові характеристики викликаних потенціалів зазнають змін. Було відзначено зменшення значень латентного періоду компонентів P1 і P2. Крім того, сеанси нейротерапії позитивно впливають на індивідуальні психо-емоційні характеристики особистості, про що свідчить виявлене зменшення рівнів «магічною» і загальної тривожності за шкалою особистісної тривожності учнів А. М. Прихожан, а також зменшення показника «труднощі спілкування» з проективної методики «Будинок - Дерево - Людина».

Ключові слова: викликані потенціали, зворотний зв'язок за характеристиками ЕЕГ, діти, підлітки.

Alieva T.A. The course of neurotherapy sessions effect on the characteristics of evoked potentials of children and adolescents / T.A. Alieva, E.V. Eismont, V.B. Pavlenko // Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No 3. – P. 3-10.

The course of neurotherapy sessions effect on the characteristics of evoked potentials of 33 6-14 years-old children were studied, assessed Go / No-Go paradigm modification. Obtained data are an evidence of the change of temporal parameters of event-related potentials after the course of neurotherapy sessions. The decreasing of P1 and P2 components latency values were observed. In addition, the neurotherapy sessions have a positive effect on the individual psycho-emotional characteristics of the person, as evidenced by the observed decreasing of the levels of the "magic" and the general anxiety by A. M. Prihojan schoolchildren's personal anxiety scale and the decrease of "the communication difficulties" by the projective psychological test "House – Tree – Person".

Keywords: evoked potentials, feedback on the characteristics of the EEG, children, adolescents.

Поступила в редакцію 22.09.2012 г.

Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского
Серия «Биология, химия». Том 25 (64). 2012. № 3. С. 11-15.

УДК 581.131:633.11

ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСНЫХ УДОБРЕНИЙ НА ПОКАЗАТЕЛИ СТРУКТУРНОГО АНАЛИЗА ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ

Богдан М.М.

*Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, Киев, Украина
E-mail: pracya_2010@ukr.net*

Исследовано влияние комплексных удобрений компании «Валагро» для внекорневых подкормок на показатели структурного анализа растений озимой пшеницы.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., комплексные удобрения.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что озимая пшеница является одной из наиболее требовательных культур к условиям произрастания и своевременной защите от болезней. Она проявляет достаточно высокую отзывчивость на внекорневое питание комплексными удобрениями. Внекорневые подкормки комплексными удобрениями создают оптимальные условия для роста и развития растений и формирования структуры урожая на этапах от фазы выхода в трубку до генеративной включительно [1-3].

На сегодняшний день в Украине имеется большой ассортимент комплексных удобрений, содержащих макро- и(или) микроэлементы в хелатной форме, предназначенные для некорневых подкормок растений. Среди них известны такие удобрения как Плантафон, Мастер, Брексил компании «Валагро» (Италия) и другие. Хелатные формы удобрений хорошо усваиваются растениями через листья и корни, оказывают положительное влияние на продуктивность и качество продукции озимой пшеницы. В тоже время, сведения о влиянии комплексных удобрений на показатель структуры урожая ограничены.

Поэтому, целью нашей работы было установление влияния удобрений на показатели структуры урожая озимой пшеницы, как важной составляющей, описывающей физиологическую активность удобрений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились в 2010-2012 годах на озимой пшенице в Опытном сельскохозяйственном производстве Института физиологии растений и генетики НАН Украины, пгт. Глеваха Васильковского района Киевской области.

Тип грунта – дерново-слабо- и среднеподзолистые неоглеенные супесчаные. Содержание гумуса 1,6-1,8 %. pH 5,9-6,5.

Обработка растений озимой пшеницы удобрениями проводилась в фазы выход в трубку и по флаговому листу ранцевым опрыскивателем в дозах: Плантафол и Мастер по 4 кг/га, Брексил Микс – 0,5 кг/га. Норма расхода воды 200 л/га.

В опытах использовали следующие виды удобрений компании «Валагро» (Италия): Плантафол 5.15.45 – с ЭДТА-хелатами микроэлементов; Брексил Микс (MgO - 6,0 %, Cu - 0,8 %, Fe - 0,6 %, Mn - 0,7 %, Mo - 1,0 %, Zn - 5,0 %) – с LSA (лигносульфонат аммония), хелатным комплексом; Мастер 18.18.18 (общий N – 18,0 %, нитратный N – 5,1 %, аммонийный N – 3,5 %, амидный N – 9,4 %, P₂O₅ - 18,0 %, K₂O - 18,0 %, MgO - 3,0 %, SO₃ - 6,0 %, В - 0,02 %, Mn - 0,03 %, Zn - 0,01 %, Cu - 0,005 %, Fe - 0,07 %) - содержит микроэлементы (Fe, Cu, Mn, Zn) в хелатной форме ЭДТА.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В условиях полевых опытов установлено, что применение удобрений – Плантафол, Брексил Микс, Мастер оказало положительное влияние на показатели структурного анализа растений озимой пшеницы: число продуктивных стеблей, высоту растений, длину главного колоса, число колосков и количество зерен в колосе, массу зёрен боковых колосков, массу зёрен главного колоса.

Данные исследований показателей структурного анализа растений озимой пшеницы показали отличия в длине главного колоса, которая составляет 10,4 см у растений обработанных Плантафолом, что на 6,1 % выше, чем у контрольных растений. Число колосков и количества зерен в колосе при обработке – 16,6 шт и 41,9 зерен, а у контрольных растений озимой пшеницы – 15,8 шт и 37,9 зёрен соответственно (табл. 1).

Таблица 1
Влияния обработки растений удобрением Плантафол на показатели структурного анализа озимой пшеницы

Показатели структурного анализа	Контроль (без обработки)	Плантафол 5.15.45
Число продуктивных стеблей, шт	4,2±0,1	4,2±0,1
Высота растений, см	90,9±1,1	91,6±0,9
Длина главного колоса, см	9,8±0,2	10,4±0,2
Масса зёрен боковых колосков, г	5,3±0,2	5,2±0,2
Число колосков главного колоса, шт	15,8±0,3	16,6±0,3
Число зёрен в колосе, шт	37,9±1,7	41,9±1,8
Масса зёрен главного колоса, г	2,0±0,1	2,3±0,1
Масса 1000 зёрен, г	53,8±0,9	55,0±0,9

Наибольшая длина колоса при обработке составила 10,4 см при 9,8 см на контроле.

Масса 1000 семян при обработке удобрением Плантафол составила 55,0 г при контроле 53,8 г.

Кореляционный анализ показателей структурного анализа озимой пшеницы, при обработке Плантафолом, выявил положительную корреляцию между числом продуктивных стеблей и массой боковых зёрен озимой пшеницы: $r = 0,56$ ($p < 0,01$), числом зёрен в колосе и числом колосков главного колоса $r = 0,79$ ($p < 0,01$), числом зёрен в колосе и массой зёрен главного колоса $r = 0,94$ ($p < 0,01$), массой зёрен главного колоса и числом колосков главного колоса $r = 0,75$ ($p < 0,01$), массой зёрен главного колоса и числом зерен в колосе $r = 0,94$ ($p < 0,01$).

Таким образом, учитывая позитивный эффект применения удобрения Плантафол на показатели структурного анализа озимой пшеницы, можно спрогнозировать потенциальное повышение урожайности озимой пшеницы, что требует дальнейших исследований в этом направлении.

Исследовали влияние обработки Брексилом Микс на длину колоса, где превышение составило 9,2 см (табл. 2).

Таблица 2
Влияния обработки растений удобрением Брексил Микс на показатели структурного анализа озимой пшеницы

Показатели структурного анализа	Контроль (без обработки)	Брексил Микс
Число продуктивных стеблей, шт	4,0±0,1	4,2±0,1
Высота растений, см	96,7±1,5	98,3±1,3
Длина главного колоса, см	9,1±0,2	9,2±0,1
Масса зёрен боковых колосков, г	4,9±0,2	5,6±0,3
Число колосков главного колоса, шт	17,7±0,2	19,1±0,3
Число зёрен в колосе, шт	44,1±1,7	49,8±1,4
Масса зёрен главного колоса, г	2,4±0,1	2,8±0,2
Масса 1000 зёрен, г	53,3±0,8	55,8±0,8

Растения озимой пшеницы, обработанные Брексилом Микс, характеризовались наибольшим количеством колосков в колосе – 19,1 шт, против 17,7 шт на контроле. Наибольшее количество зёрен в главном колосе – 2,8 зерна, в контрольном варианте – 0,5 зерна.

Применение Брексила Микс привело к увеличению массы 1000 зёрен, которая составила 55,0 г против 53,8 г на контроле.

Кореляционный анализ показателей структурного анализа растений озимой пшеницы, удобренных Брексилом Микс, показал: положительную корреляцию между числом колосков главного колоса и числом зёрен в колосе $r = 0,52$ ($p < 0,05$), числом колосков главного колоса и массой зёрен главного колоса $r = 0,62$ ($p < 0,01$), числом зерен в колосе и числом колосков главного колоса $r = 0,52$ ($p < 0,05$), числом зерен в колосе и массой зёрен главного колоса $r = 0,57$ ($p < 0,05$), массой зёрен главного колоса и числом колосков главного колоса $r = 0,62$ ($p < 0,05$), массой зёрен главного колоса и числом зерен в колосе $r = 0,57$ ($p < 0,01$).

Таким образом, Брексил Микс в данных опытах оказался наиболее эффективным препаратом по воздействию на показатели структурного анализа озимой пшеницы.

Также исследовали действие удобрения Мастер 18.18.18 на показатели структурного анализа озимой пшеницы (табл. 3).

Таблица 3
Влияния обработки растений удобрением Мастер на показатели структурного анализа озимой пшеницы

Показатели структурного анализа	Контроль (без обработки)	Мастер 18.18.18
Число продуктивных стеблей, шт	$4,4 \pm 0,1$	$4,2 \pm 0,1$
Высота растений, см	$85,1 \pm 0,6$	$84,7 \pm 0,7$
Длина главного колоса, см	$7,9 \pm 0,1$	$8,1 \pm 0,2$
Масса зёрен боковых колосков, г	$4,6 \pm 0,2$	$4,8 \pm 0,2$
Число колосков главного колоса, шт	$14,9 \pm 0,2$	$15,4 \pm 0,3$
Число зерен в колосе, шт	$35,9 \pm 1,3$	$36,6 \pm 0,8$
Масса зёрен главного колоса, г	$1,9 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,1$
Масса 1000 зёрен, г	$52,6 \pm 0,5$	$54,8 \pm 0,5$

Длина колоса при обработке удобрением Мастер составила 8,1 см, против 7,9 см на контроле. При обработке удобрением количество колосков в колосе составляло 15,4 шт, на контроле – 14,9 шт.

Количество зёрен в колосе при обработке удобрением Мастер составляло 36,6 против 35,9 на контроле. Данные табл. 3 показывают, что содержание продуктивных стеблей при обработке удобрением Мастер ниже на 5 %, чем без обработки соответственно. Число зёрен в колосе является основным показателем структуры урожая, поэтому между озернённостью колоса и урожайностью зерна отмечается прямая зависимость.

Основные достоверные положительные корреляции между показателями структурного анализа растений озимой пшеницы при применении удобрения

Мастер следующие: между числом колосков главного колоса и числом зерен в колосе $r = 0,45$ ($p < 0,05$), числом зёрен в колосе и числом колосков главного колоса $r = 0,45$ ($p < 0,05$), числом зёрен в колосе и массой зёрен главного колоса $r = 0,61$ ($p < 0,01$), массой зёрен главного колоса и числом колосков главного колоса $r = 0,61$ ($p < 0,01$).

Таким образом, установили, что применение удобрения Мастер 18.18.18 оказалось положительное влияние на урожайность озимой пшеницы в полевых условиях.

ВЫВОД

Нашиими исследованиями установлено, что применение удобрений компании «Валагро» (Италия) – Плантафол 5.15.45, Брексил Микс, Мастер 18.18.18 положительно влияет на показатели структурного анализа растений озимой пшеницы и, соответственно, на урожай озимой пшеницы.

Обработка комплексным удобрением с микроэлементами Брексил Микс показала, что на легких грунтах на протяжении 2010-2012 гг. наибольший эффект проявился на длине колоса, количестве колосков в колосе и количестве зёрен в главном колосе. Также применение удобрения Брексил Микс привело к увеличению массы 1000 зёрен, которая составила 55,0 г против 53,8 г на контроле.

Список литературы

1. Эффективность внекорневых подкормок на посевах пшеницы озимой : матеріали міжнар. наук.-практ. конф. [«Наукові основи землеробства у зв'язку з потеплінням клімату»], (Миколаїв, 10–12 лист. 2010 р.) / Н. П. Бордюжа // М-во аграр. політики, Миколаїв. держ. аграр. ун-т. [та ін.], 2010. – С. 102–105.
2. Моргун В. В. Физиологические основы формирования высокой продуктивности зерновых злаков / В. В. Моргун, В. В. Швартай, Д. А. Киризий // Физиология и биохимия культурных растений. – 2010. – Т. 42, № 5. – С. 371–392.
3. Моргун В. В. Клуб 100 центнерів. Сорти та оптимальні системи вирощування озимої пшениці / В. В. Моргун, Є. В. Санін, В. В. Швартай. – К. : Логос, 2012. – 131 с.

Богдан М.М. Вплив комплексних добрив на показники структурного аналізу озимої пшениці / М.М. Богдан // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2012. – Т. 25 (64), № 3. – С. 11-15.

Досліджено вплив сучасних комплексних добрив компанії «Валагро» на показники структурного аналізу рослин озимої пшениці.

Ключові слова: *Triticum aestivum L*, комплексні добрива.

Bogdan M.M. Influence of complex fertilizers on performance structural analysis of winter wheat / M.M. Bogdan // Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No 3. – P. 11-15.

Investigated the influence of the modern complex fertilizers company «Valagro» on indicators of structural analysis of plants of winter wheat.

Keywords: *Triticum aestivum L*, complex fertilizers.

Поступила в редакцию 19.09.2012 г.

УДК 612: 015.3:796.015.52-053

ГЕНДЕРНІ ВІДМІННОСТІ МЕТАБОЛІЗМУ L-АРГІНІНУ В СПОРТСМЕНІВ

Богдановська Н.В.

Запорізький національний університет, Запоріжжя, Україна
E-mail: nadezhda@rambler.ru

Проведено дослідження 26 спортсменів високої кваліфікації різної статі, адаптованих до тривалого виконання важкої фізичної роботи високої інтенсивності. Показано наявність гендерних відмінностей в окисному та неокисному метаболізмі L-аргініну, в т.ч. в системі синтезу оксиду азоту (окисному de novo і неокисному реутилізаційному шляхах синтезу NO), на різних етапах їхньої змагальної діяльності. На етапі максимальних функціональних можливостей і адаптації (початок змагального періоду) у дівчат превалював неокисний метаболізм аргініну за участю аргінази над окисною деградацією L-аргініну за участю NO-сінтаз. Під час зниження функціональних можливостей (дезадаптації у середній та кінцевий період змагань) необхідний рівень синтезу оксиду азоту забезпечується у дівчат переважно за рахунок ресинтезу оксиду азоту із його стабільних метаболітів, тоді як у юнаків – за рахунок збільшення окисного de novo синтезу оксиду азоту (як конститутивного, так і індукційного).

Ключові слова: L-аргінін, NO-сінтази, шляхи синтезу, фізичні навантаження, високотреновані спортсмени, юнакі, дівчата, фізична працездатність.

ВСТУП

Гендерні відмінності в реакції організму при фізичних навантаженнях за рахунок системи синтезу оксиду азоту наразі мають не тільки важливе теоретичне значення для загальної фізіології та фізіології м'язової діяльності, але і суттєве практичне – у зв'язку з можливістю організації науково-обґрунтованої системи біохімічної корекції функціонального стану організму в умовах довготривалої дії екстремальних зовнішніх факторів.

На сьогодні, більшість публікацій, пов'язаних з проблемою оксиду азоту, присвячена питанням оцінки ефективності його практичного використання в якості структурного елементу різноманітних біологічно активних добавок, але не вивченню фізіологічних механізмів впливу оксиду азоту на функціональний стан та функціональні можливості організму під час систематичного виконання м'язової роботи та особливостей перебудови системи синтезу NO на різних етапах тренувальної та змагальної діяльності [1–4].

На жаль відсутні комплексні наукові дослідження, присвячені вказаним питанням, особливо що стосується участі різних шляхів біосинтезу оксиду азоту – окисного de novo та неокисного реутилізаційного – в забезпеченні оптимальних рівнів оксиду азоту за різних функціональних станів, а також гендерні відмінності цих процесів.

Раніше нами було досліджено синтез оксиду азоту у спортсменів різної статі в

тренувальний період за адаптації до фізичних навантажень [5-8].

Безсумнівна актуальність і практична значимість перерахованих питань стали передумовами для проведення даного дослідження. Метою цієї роботи було вивчення гендерних відмінностей в метаболізмі L-аргініну у високотренованих спортсменів високої кваліфікації.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

В експерименті взяли участь 26 спортсменів високої кваліфікації у віці від 20 до 25 років, що систематично (протягом 10-12 років) виконували м'язову роботу високого об'єму та інтенсивності.

В плазмі крові (збагачений білокрівцями) юнаків та дівчат визначали біохімічні показники які характеризують інтенсивність обміну аргініну за двома альтернативними (неокисному аргіназному й окисному NO-сінтазному) шляхами метаболізму. Інтенсивність неокисного метаболізму оцінювали, визначаючи активність аргінази й вміст сечовини, що утворюється при роботі цього ферменту. Інтенсивність окисної деградації аргініну (за якої утворюється оксид азоту шляхом de novo синтезу) оцінювали за активністю різних ізоферментів NO-сінтаз – кальційзалежної конститутивної (визначалася сумарна активність eNOS + nNOS=cNOS,) і кальційнезалежної індуцибельної (iNOS) сінтази оксиду азоту, а також за рівнем циркулюючих стабільних метаболітів оксиду азоту – нітрат- (NO_2^-) і нітрат- (NO_3^-) аніонів. Оцінювали інтенсивність неокисної реутилізації нітрат-аніонів для ресинтезу оксиду азоту (salvage), визначаючи НАДФ-залежну нітратредуктазну активність. Всі вказані показники (в розрахунку на 1мг загального білка плазми) визначали в плазмі крові згідно описаних раніше методів [5, 8].

Використовуючи визначені значення показників, розраховували величини співвідношень цих показників, а саме:

- величину індексу оксигеназії (ІО, умовні одиниці, у.о.) за наступною формулою $\text{IO} = [\text{вміст } \text{NO}_2^-] \times 1000 / [\text{вміст } \text{NO}_3^-] + [\text{вміст сечовини}]$;
- частку вмісту нітрат-аніона ($\% \text{NO}_2$, %) в сумарному пулі стабільних метаболітів оксиду азоту за формулою $\% \text{NO}_2 = [\text{вміст } \text{NO}_2^-] \times 100 / [\text{вміст } \text{NO}_3^-] + [\text{вміст } \text{NO}_2^-]$;
- частку активності iNOS ($\% \text{iNOS}$, %) у сумарній активності NO-сінтаз за формулою: $\% \text{iNOS} = \text{активність iNOS} / \text{активність} [\text{iNOS} + \text{cNOS}]$;
- величину співвідношення (в у.о.) активностей неокисного (аргіназного) і різних шляхів окисного (NO-сінтазного) метаболізму аргініну через величину відношення активностей аргінази й сумарної та різних ізоферментів NOS (активність аргінази / активність $[\text{iNOS} + \text{cNOS}]$, активність аргінази / активність iNOS і активність аргінази / активність cNOS);
- величину співвідношення (в у.о.) окисного de novo і неокисного salvage шляхів синтезу оксиду азоту, визначаючи величину співвідношення активностей ферментів цих різних шляхів синтезу оксиду азоту (активність нітратредуктази / сумарна активність NOS, активність нітратредуктази / активність iNOS і активність нітратредуктази / активність cNOS).

Розраховували відносні зміни (D, %) досліджених біохімічних показників щодо певного періоду або контролю за наступною формулою $D = 100 \times (X_i - X_n) / X_n$.

Біохімічні показники визначали в плазмі крові тренованих юнаків та дівчат три рази: на початку, у середині й наприкінці змагального періоду (ЗП). Тривалість підготовчого періоду, що передував ЗП, складала 3 місяці, в процесі якого фізичні навантаження виконувалися за відсутності факторів психологічного стресу. У змагальному періоді (травав 8 місяців) фізичні навантаження виконувалися як у тренувальному безстресовому режимі, так і в додаткових стресових умовах відповідальних змагань.

Обрана схема ґрунтувалася на тому, що ми оцінювали динаміку зміни активності різних шляхів синтезу оксиду азоту на початку змагального періоду (на піку фізичної форми спортсменів, досягнутої в процесі тренувальних занять), в середині змагального періоду (через 8 місяців після початку тренувань і через 3 місяці після початку змагань) і наприкінці змагального періоду (через 11 місяців після початку тренувань і через 8 місяців після початку змагань).

Одночасно з біохімічними показниками у спортсменів також визначали величину загальної фізичної працездатності (вPWC₁₇₀, кгм/хв/кг) і величину аеробної продуктивності (вМСК, мл/хв/к) їхнього організму за допомогою субмаксимального велоергометричного тесту PWC₁₇₀.

Всі отримані в ході експерименту дані були оброблені стандартними методами математичної статистики з використанням статистичного пакета Microsoft Exell.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Попередніми нашими дослідженнями було встановлено об'єктивне існування певної динаміки в системі синтезу оксиду під час тривалого тренувального періоду, що не залежали від статі [1, 5-8]. Показано, що на етапі інтенсивних фізичних навантажень, не обтяжених психоемоційним стресом (період підготовки до змагального сезону), основна роль у забезпеченні організму оксидом азоту в адаптованих спортсменів (як юнаків, так і дівчат) належить в основному конститутивному *de novo* синтезу і, меншою мірою, ресинтезу NO за участю нітратредуктази при одночасній дуже високій активності неокисного аргіназного метаболізму L-аргініну.

Було відзначено, що багатостадійний неокисний аргіназний метаболізм аргініну забезпечує організм спортсменів низькомолекулярними антиоксидантами (сечовина, поліаміни) і біорегуляторами (сечовина, поліаміни, ГАМК), а також попередниками основного білка сполучної тканини – коллагену, що мають важливе значення для повноцінної адаптації організму спортсменів до виконання фізичної роботи значного об'єму й тривалості.

З точки зору практичного використання результатів, безсумнівно значимим для нас, було виявлення гендерних особливостей взаємозв'язку між рівнем рівнем функціональної підготовки високопрофесійних спортсменів (PWC₁₇₀ та МСК) і рівнем біосинтезу оксиду азоту різними шляхами (*de novo* та salvage).

Представлені результати обстеження високотренованих спортсменів різної статі на початку змагального періоду, що характеризується найбільш високим рівнем фізичної підготовленості організму, свідчать про те, що в групі юнаків реєструвалися вірогідно більш високі, ніж у дівчат, величини функціональних

параметрів PWC₁₇₀ та МСК (табл. 1 та табл. 2).

Таблиця 1.
Величини вивчених розрахованих показників у високотренованих юнаків і дівчат на початку змагального періоду ($\bar{X} \pm m$)

Показники	Дівчата	Юнаки	D, %
Аргіназа, нмоль/хв мг білка	2,69±0,32	2,09±0,28	-22,25
cNOS, пмоль /хв мг білка	48,01±4,50	58,49±3,85	21,82
iNOS, пмоль /хв мг білка	8,54±1,47	12,34±0,878	44,53
Нітратредуктаза, нмоль/хв мг білка	4,62±0,25	3,47±0,19**	-25,02
Нітрит-аніон, пмоль/мг білка	296,87±36,22	324,54±20,56	9,32
Нітрат-аніон, нмоль/мг білка	1,36±0,14	1,67±0,15	22,63
Сечовина, нмоль/мг білка	71,98±7,56	75,83±2,19	5,35
Загальна фізична працездатність, кгм/хв/кг	20,24±0,58	27,14±1,49***	34,12
Аеробна продуктивність, мл/хв/кг	59,99±1,27	71,14±3,26**	18,59

Примітка: тут і далі *, **, *** - різниця достовірна ($P < 0,05, 0,01, 0,001$) стосовно значення в групі дівчат, D - величини відносної різниці, %.

В попередніх наших роботах було відзначено, що для всіх обстежених, незалежно від статі, домінуюча роль у забезпеченні оптимального рівня синтезу оксиду азоту на етапі підготовки до сезону (на різних етапах тренувального періоду) належала конститутивному de novo (cNOS) при участі salvage шляху (нітратредуктаза) його утворення при одночасній високій активності неокисної деградації аргініну (аргіназа). На початку змагального періоду активність нітратредуктази в групі дівчат була вірогідно вищою, ніж у юнаків. Навпаки, серед юнаків реєструвалися більш високі значення активностей як конститутивного (cNOS), так і індуцибельного (iNOS) шляхів de novo синтезу NO, що досягали достовірності різниці для значень сумарної активності NOS у юнаків і дівчат. Достовірно вищою була у юнаків і частка iNOS в сумарній активності NOS.

Для високотренованих дівчат, оптимально адаптованих до тривалої фізичної роботи великої інтенсивності, були характерні статистично достовірні більш високі значення співвідношень активностей обох неокисних ферментативних активностей (аргінази й нітратредуктази), що не потребують кисню для своєї роботи з величинами активності ферментів окисного метаболізму (cNOS та iNOS), що потребують кисень для синтезу оксиду азоту. Вірогідні ж відмінності в рівні фізичної працездатності та аеробної продуктивності виглядали як природні статеві відмінності.

Таблиця 2.
Величини розрахованих показників у високотренованих юнаків і дівчат на початку змагального періоду ($\bar{X} \pm m$)

Показники	Дівчата	Юнаки	D, %
Аргіназа / cNOS, у.о.	61,09 \pm 8,67	37,68 \pm 6,13*	-38,32
Аргіназа / iNOS, у.о.	381,76 \pm 55,58	172,23 \pm 23,94***	-54,89
Нітратредуктаза/cNOS, у.о.	107,04 \pm 11,90	62,00 \pm 5,19***	-42,08
Нітратредуктаза/iNOS, у.о.	739,59 \pm 114,13	289,38 \pm 19,92***	-60,87
Індекс оксигенації, у.о.	5,86 \pm 1,91	4,24 \pm 0,31	-27,66
Частка iNOS, %	14,83 \pm 1,78	17,75 \pm 1,30*	19,67
Частка NO ₂ , %	67,02 \pm 2,64	65,92 \pm 2,37	-1,63

В середині змагального періоду (табл. 3 та табл. 4), що характеризується потужним зовнішнім впливом на організм у вигляді поєднаних тренувальних і змагальних навантажень, обтяжених психологічним стресом, ми спостерігали одночасно із зниженням функціональної підготовленості спортсменів (зниження величин загальної фізичної працездатності й максимального споживання кисню у юнаків і дівчат при вірогідно більш високих значеннях даних показників у групі юнаків) певні статеві відмінності й відносно стану системи синтезу оксиду азоту.

Таблиця 3.
Величини вивчених показників у високотренованих юнаків і дівчат в середині змагального періоду ($\bar{X} \pm m$)

Показники	Дівчата	Юнаки	D, %
Аргіназа, нмоль/хв мг білка	1,38 \pm 0,19	1,31 \pm 0,29	-5,03
cNOS, пмоль /хв мг білка	56,45 \pm 3,05	71,67 \pm 6,42*	26,98
iNOS, пмоль /хв мг білка	7,90 \pm 1,55	10,43 \pm 1,36	32,00
Нітратредуктаза, нмоль/хв мг білка	3,47 \pm 0,18	2,37 \pm 0,28**	-31,86
Нітрит-аніон, пмоль/мг білка	348,94 \pm 27,33	378,05 \pm 46,89	8,34
Нітрат-аніон, нмоль/мг білка	1,76 \pm 0,07	1,02 \pm 0,13***	-42,18
Сечовина, нмоль/мг білка	77,60 \pm 5,17	57,65 \pm 5,66**	-25,71
Загальна фізична працездатність, кгм/хв/кг	16,61 \pm 0,99	23,86 \pm 0,62***	43,65
Аеробна продуктивність, мл/хв/кг	52,04 \pm 2,24	63,77 \pm 1,30***	22,53

В середині ЗП, незалежно від статі, домінуюча роль в синтезі оксиду азоту належить неокисному шляху ресинтезу NO з його стабільних метаболітів при збереженні важливої ролі окисного конститутивного de novo синтезу. В той же час, в середині ЗП для спортсменів була характерна вірогідно більш висока, ніж для спортсменок з нищими значеннями фізіологічних параметрів адаптації і тренування, активність конститутивної NO-сінтази (на 26,98%), і, навпаки, вірогідно менші значення активності нітратредуктази (на 31,78%) і концентрацій нітрат-аніону (на 42,18%) і сечовини (на 25,71%) в плазмі крові.

Таблиця 4.

Величини розрахованих показників у високотренованих юнаків і дівчат
в середині змагального періоду ($\bar{X} \pm m$)

Показники	Дівчата	Юнаки	D, %
Аргіназа / cNOS, y.o.	22,37 \pm 3,49	15,25 \pm 2,80	-31,80
Аргіназа / iNOS, y.o.	25,20 \pm 3,81	17,66 \pm 3,42	-29,90
Нітратредуктаза/cNOS, y.o.	55,78 \pm 4,06	30,98 \pm 4,34***	-44,46
Нітратредуктаза/iNOS, y.o.	62,97 \pm 4,31	35,71 \pm 5,15***	-43,28
Індекс оксигенації, y.o.	4,85 \pm 0,71	6,99 \pm 0,96	44,01
Частка iNOS, %	11,52 \pm 1,60	12,66 \pm 1,15	9,95
Частка NO ₂ , %	65,51 \pm 1,96	77,21 \pm 2,65**	17,86

Враховуючи, що нітрат є маркером утворення пероксинітрату при взаємодії супероксиду та оксиду азоту і високі рівні синтезу останнього, можна припустити, що у спортсменів функціонує більш потужна антиоксидантна система, ніж у спортсменок, або генерується менше супероксиду. В той же час, у спортсменок реєструвалися вірогідно більш високі ніж у спортсменів значення співвідношень активностей ферментів неокисного і окисного шляхів синтезу оксиду азоту – нітратредуктаза/cNOS (на 44,46%) та нітратредуктаза/iNOS (на 43,28%).

В середині змагального періоду на фоні поєднаної дії високих фізичних та психологічних навантажень та зменшення ролі багатостадійного неокисного метаболізму аргініну, що забезпечував високий рівень адаптації до фізичної роботи як дівчат, так і юнаків шляхом синтезу низки важливих біологічних речовин, для спортсменок також була характерна більш висока інтенсивність неокисного ресинтезу NO з його стабільних метаболітів, тоді як для спортсменів – окисної деградації L-аргініну за участю cNOS.

Як було відзначено в попередніх публікаціях, наприкінці змагального періоду, що характеризується інтенсивним наростанням ознак природного стомлення й відповідним суттєвим зниженням фізичної працездатності організму і рівня адаптації домінуюча роль в синтезі оксиду азоту належить вже конститутивному окисному синтезу оксиду азоту при збереженні певної ролі його неокисного ресинтезу.

Відповідно до даних табл. 5 та табл. 6, на даному етапі дезадаптації у спортсменів (як юнаків, так і дівчат) мало місце одночасно зі зниженням їхньої фізичної працездатності й аеробної продуктивності ще й помітні зміни в синтезі оксиду азоту. Так для дівчат з низькими рівнями фізіологічних показників реєструвалися більші, ніж серед юнаків,пули нітрат-аніону, а, отже і пули його попередника пероксинітрату (на 62,99%) та активності нітратредуктази (на 37,92%) в плазмі крові.

Навпаки, наприкінці змагального періоду юнаки звищими фізіологічними показниками мали перевагу в активності як індуцибельного синтезу оксиду азоту (на 27,57%), так і конститутивного його синтезу (на 21,27%). Для спортсменок в цей період була характерна більш висока інтенсивність неокисного ресинтезу оксиду азоту в порівнянні з його окисним синтезом за участю різних ізоформ NO-сінтаз.

Таблиця 5.
Величини вивчених показників у високотренованих юнаків і дівчат наприкінці змагального періоду ($\bar{X} \pm m$)

Показники	Дівчата	Юнаки	D, %
Аргіназа, нмоль/хв мг білка	1,32±0,08	1,91±0,07***	44,33
cNOS, пмоль /хв мг білка	31,82±1,91	38,59±3,13	21,27
iNOS, пмоль /хв мг білка	15,96±1,50	20,36±1,42*	27,57
Нітратредуктаза, нмоль/хв мг білка	3,90±0,36	2,42±0,27**	-37,92
Нітрит-аніон, пмоль/мг білка	340,74±20,56	309,34±13,70	-9,22
Нітрат-аніон, нмоль/мг білка	3,61±0,68	1,34±0,06**	-62,99
Сечовина, нмоль/мг білка	70,37±2,99	65,72±2,94	-6,61
Загальна фізична працездатність, кгм/хв/кг	12,47±0,59	20,81±1,07***	66,92
Аеробна продуктивність, мл/хв/кг	43,31±1,50	48,64±2,12*	12,29

Таким чином, результати проведеного дослідження дозволили констатувати наявність певних статевих відмінностей в системі синтезу оксиду азоту в залежності від стадії адаптації організму тренованих осіб до фізичних та психологічних навантажень.

Було встановлено, що в процесі зростання дії цих екстремальних зовнішніх впливів в тренованих дівчат відмічається більш висока інтенсивність відновлювального ресинтезу оксиду азоту з його стабільних метаболітів, тоді як серед тренованих юнаків – більш високий рівень активності окисного de novo синтезу NO різними ізоформами NO-сінтаз (як конститутивною, так і індуцибельною).

На різних етапах (початок, середина, кінець змагального періоду), необхідний рівень синтезу оксиду азоту забезпечується також за рахунок поступового

підвищення активності індуцибельного синтезу NO, що було показано нами як для юнаків так і для дівчат. Власне, за рахунок значного підвищення останнього (що, можливо, є першопричиною всіх змін) можна пояснити як поступове зниження активності конститутивного синтезу (це давно відомий [9] феномен реципрокної взаєморегуляції активності iNOS та cNOS), так і активності редуктазного синтезу NO (регулятором якого є в першу чергу доступність кисню [10], а не субстрату, нітрату, циркулюючі пули якого, навпаки, зростають в динаміці змагального періоду, як і пули нітрату, внаслідок, в т.ч., обмеження швидкості їхньої реутилізації для синтезу NO).

Зростання одночасно і пулів нітрату (за рахунок зменшення реутилізації анітрапредуктазою) і пулів нітрату вказує також і на можливе зниження нітратредуктазної активності в плазмі крові, яку ми безпосередньо не вимірювали. Несподівано, підвищенням активності iNOS можна пояснити також і зниження активності аргіназного метаболізму аргініну, а саме для обмеження утворення сечовини, яка, за рахунок утворення уреїдосукцинату [11] може інгібувати такий необхідний для роботи iNOS ресинтез аргініну з цитруліну в цитруліновому циклі [12].

Вірогідною причиною зростання активності iNOS (майже виключно за рахунок індукції цього ферменту) в процесі змагального періоду у спортсменів і у спортсменок, може бути одночасне підвищення як пулів індукторів (прозапальних цитокінів TNF α , INF-gamma, IL-1 β та ін.), так і генерації активатора індукції – супероксиданіону [13]. Активація цього ферменту може мати негативні наслідки для роботи серця спортсменів, підвищуючи апоптоз кардіоміоцитів [14, 15].

Таблиця 6.

Величини розрахованих показників у високотренованих юнаків і дівчат
наприкінці змагального періоду ($\bar{X} \pm m$)

Показники	Дівчата	Юнаки	D, %
Аргіназа / cNOS, у.о.	28,41 \pm 2,03	33,24 \pm 1,82	17,01
Аргіназа / iNOS, у.о.	43,87 \pm 4,51	51,58 \pm 3,21	17,59
Нітратредуктаза/cNOS, у.о.	83,64 \pm 8,09	42,17 \pm 4,86***	-49,58
Нітратредуктаза/iNOS, у.о.	127,28 \pm 12,90	65,68 \pm 8,11***	-48,40
Індекс оксигенації, у.о.	4,72 \pm 0,39	4,77 \pm 0,40	1,13
Частка iNOS, %	33,33 \pm 3,06	34,82 \pm 2,08	4,48
Частка NO ₂ , %	53,20 \pm 4,82	69,69 \pm 1,14**	30,99

На нашу думку матеріали проведеного дослідження є істотним доповненням до наявних відомостей щодо гендерних відмінностей метаболізму L-аргиніну та ролі оксиду азоту в забезпеченні адаптації до систематичної м'язової діяльності.

Перспективами подальших досліджень є проведення більш детального вивчення ступеня функціональної залежності між рівнем фізичної працездатності, з одного

боку, і станом систем кровообігу і синтезу оксиду азоту, з іншого, в процесі фізичних тренувань.

ВИСНОВКИ

1. Серед спортсменів різної статі з максимальними величинами фізичної працездатності та аеробної продуктивності (на початку змагального періоду) домінуюча роль у забезпеченні оптимального рівня синтезу оксиду азоту належить окисному конститутивному de novo синтезу та неокисному реутилізаційному синтезу при одночасній високій активності неокисної деградації аргініну аргіназою.
2. У дівчат з максимальними величинами фізичної працездатності та аеробної продуктивності (на початку змагального періоду), але з меншими значеннями функціональних параметрів ніж у юнаків, вищою, ніж у юнаків була активність нітратредуктази і значення співвідношень активностей обох неокисних ферментативних активностей (аргінази й нітратредуктази), що не потребують кисню для своєї роботи, з величинами активності ферментів окисного метаболізму (cNOS та iNOS), що потребують кисень для синтезу оксиду азоту.
3. У спортсменів з максимальними величинами фізичної працездатності та аеробної продуктивності (на початку змагального періоду) реєструвалися більш високі значення активностей як конститутивного, так і індуцибельного окисного de novo синтезу NO. Достовірно вищою була у юнаків і частка iNOS в сумарній активності NOS.
4. В середині змагального періоду, що характеризується потужним зовнішнім впливом на організм у вигляді поєднаних тренувальних і змагальних навантажень, обтяжених психологічним стресом, одночасно зі зниженням загальної фізичної працездатності й максимального споживання кисню (у юнаків в меншій мірі ніж у дівчат), незалежно від статі домінуюча роль в синтезі оксиду азоту належить неокисному шляху ресинтезу NO з його стабільних метаболітів при збереженні важливої ролі окисного конститутивного de novo синтезу.
5. В середині змагального періоду для спортсменів з більш високими фізіологічними показниками була характерна вища, ніж для спортсменок активність конститутивної NO-сінтази, і, навпаки, менші значення активності нітратредуктази і концентрації нітрат-аніону і сечовини в плазмі крові. У спортсменок реєструвалися вірогідно більш високі значення співвідношень активностей ферментів неокисного і окисного шляхів синтезу оксиду азоту – нітратредуктаза/cNOS та нітратредуктаза/iNOS.
6. При мінімальних значеннях фізіологічних показників (наприкінці змагального періоду) у спортсменів, незалежно від статі, домінуюча роль в синтезі оксиду азоту належить окисному конститутивному de novo синтезу при збереженні певної ролі його неокисного ресинтезу .
7. У спортсменок з низькими значеннями фізіологічних показників була характерна більш висока інтенсивність неокисного ресинтезу оксиду азоту в порівнянні з його окисним de novo синтезом за участю різних ізоформ NO-

- синтаз (реєструвалися більші ніж у спортсменів пули нітрат-аніону та вища активність нітратредуктази в плазмі крові).
8. Наприкінці змагального періоду спортсмени з більш високими значеннями фізіологічних показників ніж у спортсменок мали перевагу в активності окисного de novo синтезу оксиду азоту (як індуцибельного, так і конститутивного).

Список літератури

1. Базілюк О.В. Вікові особливості змін системи оксиду азоту в аорті та плазмі за умов адаптації до фізичних навантажень / О.В. Базілюк, А.В Коцюруба., Л.Г. Степаненко // Фізіол. журн. – 2010. – Т. 56, № 1. – С. 3-12.
2. Ziche M. Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis / M. Ziche, L. Morbidelli, D.R. Choudhuri // J. Clin. Invest. – 1997. – 99, № 11. – P. 2625-2634.
3. Diwan A.D. Nitric oxide modulates fracture healing / A.D. Diwan, M.X. Wang, D. Jang // J. Bone Miner Res. – 2000. – 15, № 2. – P. 342-351.
4. Defron D.T. Role of nitric oxide in wound healing / D.T. Defron, D. Most, A. Barbul // Curr Opin Clin Nutr Metab Care. – 2000. – 3, № 3. – P. 197-204.
5. Богдановская Н.В. Оценка роли сосудистого эндотелия в обеспечении физической подготовленности девушек-волейболисток на этапе интенсивной соревновательной деятельности / Н.В. Богдановская, Н.В. Маликов, А.Н. Святодух // Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки. – 2008. – №1. – С. 40-43.
6. Богдановська Н.В. Особливості функціонального стану судинного ендотелію при систематичних фізичних навантаженнях / Н.В. Богдановська, М.В. Маліков // Фізіол. журн. – 2008. – Т. 54, № 4. – С. 44-46.
7. Богдановська Н.В. Синтез оксиду азоту у період довгострокової адаптації до інтенсивної м'язової роботи у спортсменок / Н.В. Богдановська, Г.М. Святодух, А.В. Коцюруба, М.В. Маліков // Фізіол. журн. – 2009. – Т. 55, № 3. – С. 94-99.
8. Bogdanovskaya N.V. Role of the system of synthesis of nitrogen oxide in providing of long duration adaptation of organism to muscular work / N.V. Bogdanovskaya, N.V. Malikov // J. Physiol. Sci. – Kyoto, 2009. – P. 442.
9. Akita Y. Exercise-induced activation of cardiac sympathetic nerve triggers cardioprotection via redox-sensitive activation of eNOS and upregulation of iNOS / Y. Akita, H. Otani, S. Matsuhisa // Am. J. Physiol. – 2007. – 292, №5. - H2051-H2059.
10. Реутов В.П. NOсинтазная и нитритредуктазная компоненты цикла оксида азота / В.П. Реутов, Е.Г. Сорокина // Біохімія – 1998. – т. 63, вып. 7. – С. 1029-1040.
11. Bianchi P.G. Use of 5(4)amino 4(5)imidazolcarboxamide ureidosuccinate in inflammatory and degenerative liver / P.G. Bianchi, E. Saccabusi // Minerva Gastroenterol. – 1972. – 18, № 4. – P. 245-256.
12. Swamy M. Decreased glutamine synthase, increased citrulline-nitric oxide cycle activities and oxidative stress in different regions of brain in epilepsy rat model / M.Swamy, W.R. Yusot, K.N. Sirajudeen // J Physiol Biochem. – 2011. – 67, № 1. – P.105-113.
13. Sureda A. Relation between oxidative stress and antioxidant endogenous defences during exhaustive exercise / A. Sureda, P. Tauler, A. Aguiló // Free Radic Res. – 2005. – 39, № 12. – P. 1317-1324.
14. Wildhirt S.M. Inducible nitric oxidr synthase activation after ischemia/reperfusion contributes to myocardial dysfunction and extent of infarct size in rabbits: evidence for a late phase of nitric oxide-mediated reperfusion injury / S.M. Wildhirt, S. Weismueller, C. Schulze // Cardiocasc. Res. – 1999. – 43, № 3. – P. 698-711.
15. Kanno S. Attenuation of myocardial ischemia/reperfusion injury by superinduction of inducible nitric oxide synthase / S. Kanno, P.C. Lee, Y. Zhang // Circulation. – 2000. – 101, № 23. – P. 2742-2748.

Богдановская Н.В. Гендерные отличия в метаболизме L-аргинина у спортсменов / Н.В. Богдановская // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2012. – Т. 25 (64), № 3. – С.16-26.

Проведено исследование 26 спортсменов высокой квалификации разного пола, адаптированных к длительному выполнению физической работы высокой интенсивности. Показано наличие гендерных отличий в окислительном и неокислительном метаболизме L- аргинина, в т.ч. в системе синтеза оксида азота (окислительном de novo и неокислительном реутилизационном путях синтеза NO), на разных этапах соревновательной деятельности. На этапе максимальных функциональных возможностей и адаптации (начало соревновательного периода) у девушек превалировал неокислительный метаболизм аргинина при участии аргиназы над окислительной деградацией L-аргинина при участии NO-синтаз. Во время снижения функциональных возможностей (дезадаптация в середине и конце периода соревнований) необходимый уровень синтеза оксида азота обеспечивается у девушек преимущественно за счет ресинтеза оксида азота из его стабильных метаболитов, тогда как у юношей – за счет увеличения окислительного de novo синтеза оксида азота (как конститутивного, так и индуцибельного).

Ключевые слова: L-аргинин, NO-синтазы, пути синтеза, физические нагрузки, высокотренированные спортсмены, юноши, девушки, физическая работоспособность.

Bogdanovskaya N.V. Gender differences of L-arginin metabolism of atletes / N.V. Bogdanovskaya // Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No. 3. – P. 16-26.

Is investigated 26 athletes of both sexes. Which are highly qualified, adapted to long-term performance at heavy physical work of high intensity. Shown gender differences in oxidative and non-oxidative metabolism L-arginine, including it in the nitric oxide synthesis system (oxidative de novo and non-oxidative reutilization routes of NO synthesis), at different stages of their competitive activities. At the stage of maximum functional abilities and adaptation (early competitive period) among girls prevailed non-oxidative metabolism of arginine with arginase over the oxidative degradation of L-arginine with NO-synthase. During reduction functional abilities (dysadaptation of secondary and final period of competition) the required level of nitric oxide synthesis provided for girls mainly due to resynthesis of nitric oxide from its stable metabolites, whereas for boys – by increasing oxidative de novo synthesis of nitric oxide (as constitutive and inducible).

Keywords: L-arginine, NO-synthase, routes of synthesis, physical activity, highly qualified athletes, youth, girls, physical performance.

Поступила в редакцию 21.09.2012 г.

УДК 581.13

ВПЛИВ ТРИНЕКСАПАК-ЕТИЛУ НА ВМІСТ АНІОНІВ У РОСЛИНАХ *HORDEUM VULGARE* L.

Вірич П.А., Маковейчук Т.І., Швартау В.В.

Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України, Київ, Україна
E-mail: Sphaenodon@ukr.net

Вивчали вплив різних концентрацій тринексапак-етилу (ТЕ, Моддусу) на вміст вільних аніонів (F^- , Cl^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-}) у прaporцевих листках рослин ячменю (*Hordeum vulgare* L.). Обробка рослин ТЕ по вегетації сприяла кращому забезпеченням фотосинтезуючих частин рослини елементами живлення. ТЕ може відігравати важливу роль у розробці систем мінерального живлення рослин.

Ключові слова: ячмінь, тринексапак-етил, аніони.

ВСТУП

Важливим елементом інтенсивних технологій вирощування зернових є запобігання виляганню, яке значно зменшує продуктивність і якість зерна. Необхідність таких заходів обумовлена застосуванням високих доз азотних добрив для максимального розкриття потенціалу продуктивності сортів. За цих умов, особливо у поєднанні із перезволоженістю та низькою інсолляцією, стебло зернових злаків може витягуватися та втрачати механічну міцність. Тому застосовують регулятори росту, які забезпечують збільшення міцності стебла рослини. До даного класу речовин відносяться ретарданти – штучні регулятори росту різної хімічної природи (онієві сполуки, N-гетероциклічні, ацилциклогександіони тощо). Вони можуть інгібувати синтез фітогормонів, блокувати їх взаємодію з клітинними рецепторами, індукувати синтез етилену, абсцизової кислоти та інших сполук, які зменшують активність меристематичних тканин.

Однією з таких сполук, яку починають широко застосовувати в сільськогосподарській практиці, є тринексапак-етил (ТЕ), який є основним складовим ретарданту «Моддус» компанії «Сингента» (Швейцарія). Його основна дія спрямована на інгібування активності ГК-20-оксидази, що каталізує кінцеві етапи синтезу гіберелінової кислоти. Відомо також його позитивний вплив на азотний обмін, вміст хлорофілів в прaporцевих листках, розвиток кореневої системи культурних рослин [1, 2].

Зазначимо, що посилення розвитку кореневої системи рослин озимих зернових може підвищувати стійкість до несприятливих умов вирощування (посуха, високі температури), сприяти кращій перезимівлі, а також посилювати поглинання елементів живлення. Останнє є виключно важливим за умов обмеження ресурсів для внесення належних рівнів мінеральних та органічних добрив у рослинництві

країни [3, 4]. Тому, можливі зміни вмісту елементів живлення у рослинах за дії ретарданту можуть бути використані у розробці інтегрованих технологій вирощування культурних рослин з високими коефіцієнтами засвоєння поживних речовин. При цьому, вплив ТЕ на вміст елементів живлення у рослинах озимих зернових є малодослідженім. Зазначимо відсутність інформації щодо вмісту аніонів у рослинах за дії ТЕ, хоча вона може бути важливим показником гомеостазу іонів.

Тому, у даній роботі методом іонної хроматографії ми дослідили вплив ТЕ на вміст вільних аніонів у прaporцевих листках ячменю.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Посів ячменю озимого (*Hordeum vulgare* L.) сорту Луксор селекції фірми Осева Ексімпо Прага с.р.о, Чехія. (с. Конельська Попівка Жашківського району Черкаської області) обробляли різними дозами (0,2, 0,3 та 0,4 л/га) препарату «Моддус» (ТЕ) компанії «Сингента» (Швейцарія) у фазу кущіння. Прaporцеві листки ячменю гомогенізували. Наважки рослинного матеріалу по 50 мг розчиняли в 50 мл ультрачистої води (Ultra Pure Water System фірми Human Corporation, Корея) та екстрагували впродовж 15 хв. для вимивання вільних аніонів у розчині. Екстракт фільтрували (0,45 нм). В аліквоті визначали вміст аніонів за допомогою іонного хроматографа IC PRO 881 Metrohm (Швейцарія) з кондуктометричним детектором (діапазон від 0 до 15 000 мкСм/см) і колонкою Metrosep A Supp 5 250Ч4,0 мм, елюент – карбонатний буфер 3,2 мМ Na_2CO_3 + 1 мМ NaHCO_3 (реактиви Merck, Німеччина) [5]. Повторність проведення досліду трикратна, аналітична – п'ятикратна. Первинну обробку даних здійснювали за допомогою програми Magic Net IC v. 1.1 Metrohm (Швейцарія), статистичний аналіз – Office Exel 2010.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що ТЕ позитивно впливає на зростання пулу вільних аніонів у тканинах прaporцевого листка (отримані результати наведені на рисунку).

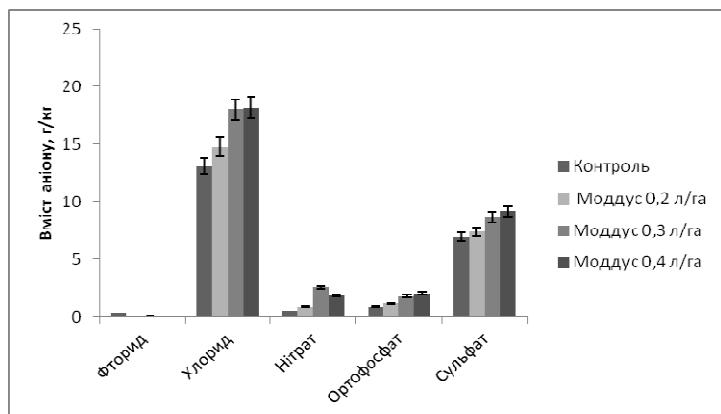


Рис. Вплив ретарданту тринексапак-етилу (Моддусу) на вміст вільних аніонів у прaporцевих листках ячменю (*Hordeum vulgare* L.), г/кг.

Так кількість сірки лінійно збільшується. В зразках, оброблених 0,4 л/га, її концентраціявища, ніж у контрольних на 23,7%. Це може позитивно впливати на білковий обмін та сприяти отриманню врожаю підвищеної якості, зважаючи на відому роль сірки у рослинах, оскільки вона є складовою частиною цистеїну та метіоніну, у формі SH-груп бере участь у формуванні редокс-гомеостазу клітин, відіграє важливу роль при оксидативному стресі [6].

Подібний вплив ТЕ визначено і для фосфору. Зі збільшенням кількості ТЕ його кількість у листках зростає понад як у 2 рази, що дозволяє підвищити активність енергетичних та синтетичних процесів у клітинах.

Також ТЕ сприяє більшому притоку нітратів до листків, на 80 %. Забезпечення достатньою кількістю азоту фотосинтезуючих частин рослини сприяє підтриманню на високому рівні інтенсивності фотосинтетичних процесів, що підвищує швидкість накопичення органічних речовин в зерні.

Зазначимо високий вміст хлору, порівняно з іншими аніонами, у прaporцевих листках ячменю озимого. Іони Cl^- є складовими фотолізуючого комплексу білків, які розщеплюють воду з виділенням молекулярного кисню. Також вони сприяють, разом з калієм і кальцієм, формуванню потенціалів плазмалеми, тонопласти, ЕПР, що відіграє важливу роль в транспорті речовин через ці мембрани. За дії ТЕ спостерігалося лінійне зростання кількості даного іону, яке складало близько 28 % в порівнянні з контролем.

Присутність фтору у рослинах ймовірно пов'язана із внесенням фосфорних добрив низької якості. Фтор, як елемент живлення рослин, недостатньо вивчений, але при його нестачі спостерігаються некрози тканин. У тварин він входить до складу кісток та емалі зубів, бере участь в кровотворенні. При надходженні в організм у значних кількостях може проявлятись його цитотоксична дія. В прaporцевих листках його вміст після обробок ТЕ дещо зменшується.

ВИСНОВОК

ТЕ забезпечує вищий вміст пулу вільних аніонів у активно фотосинтезуючих частинах рослини, що дозволяє підвищувати інтенсивність метаболічних процесів і, як наслідок, сприяти накопиченню більшої біомаси рослин. Тринексапак-етил підвищує стійкість ячменю озимого до вилягання, а також впливає на зміни гомеостазу іонів, які є складовими формування урожайності посіву. Отримані результати можуть бути використані при розробці комплексних систем живлення озимих зернових культур.

Список літератури

1. Effect of Nitrogen and Trinexapac-Ethyl Rates on the SPAD index of wheat leaves / M. C. Epindula, V. C. Rocha, P. C. R. Fontes [et al.] // Journal of Plant Nutrition. – 2009. – № 32. – P. 1956–1964.
2. Use of growth retardants in wheat / M. C. Epindula, V. C. Rocha, J. A. S. Grossi [et al.] // Planta Daninha. – 2009. – № 27. – P. 379–387.
3. Моргун В. В. Физиологические основы формирования высокой продуктивности зерновых злаков / В. В. Моргун, В. В. Швартай, Д. А. Киризий // Физиология и биохимия культурных растений. – 2010. – Т. 42, № 5. – С. 371–393.

4. Швартай В. В. Основи іономіки рослин / В. В. Швартай, В. В. Моргун // Фізіологія рослин: проблеми та перспективи розвитку. – К. : Логос, 2009. – Т. 2. – С. 232–242.
5. Eith C. Practical Ion Chromatography / C. Eith, M. Kolb, A. Seubert. – Metrohm Ltd., Herisau, Switzerland, 2001. – 161 p.
6. Perez-Perez M. E. Reactive oxygen species and autophagy in plants and algae / M. E. Perez-Perez, S. D. Lemaire, J. L. Crespo // Plant Physiol. – 2012. – № 159 (2). – P. 529–872.

Вирич П.А. Влияние тринексапак-етила на содержание анионов в растениях *Hordeum vulgare* L. / П.А. Вирич, Т.И. Маковейчук, В.В. Швартай // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2012. – Т. 25 (64), № 3. – С.27-30.

Изучили влияние разных концентраций тринексапак-етила (ТЕ, Моддус) на содержание свободных анионов (F⁻, Cl⁻, NO₃⁻, PO₄³⁻, SO₄²⁻) во флаговом листе растений ячменя (*Hordeum vulgare* L.). Обработка растений ТЕ по вегетации способствовала лучшему обеспечению фотосинтезирующих частей растения элементами питания. ТЕ может играть важную роль в разработке систем минерального питания растений.

Ключевые слова: ячмень, тринексапак-етил, анионы.

Virych P.A. Influence of trinexapac-ethyl on content anions in plants of *Hordeum vulgare* L. / P.A. Virych, T.I. Makoveychuk, V.V. Schwartau // Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No. 3. – P. 27-30.

The effect of different concentrations trinexapac-ethyl (TE, Moddus) on the content of free anions (F⁻, Cl⁻, NO₃⁻, PO₄³⁻, SO₄²⁻) in flag-leaf of plants barley (*Hordeum vulgare* L.) was studied. Processing plant retardant TE on plants in tillering phase contributed to better ensure the photosynthetic parts of the plant nutrients. TE can play an important role in the development of mineral nutrition systems of plants.

Keywords: barley, trinexapac-ethyl, anions.

Поступила в редакцию 11.09.2012 г.

УДК 612.345:632.95:591.434.1:577.114-021.632

**ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ ПРЕПАРАТІВ З ПРОБІОТИЧНИМИ
МІКРООРГАНІЗМАМИ НА МОРФОМЕТРИЧНІ ПОКАЗНИКИ ТОВСТОГО
КІШКІВНИКА, ПЕЧІНКИ, ПІДШЛУНКОВОХ ЗАЛОЗИ ЩУРІВ З
АЛЛОКСАНОВИМ ДІАБЕТОМ**

Данилова А.О.¹, Запорожченко О.В.¹, Большаков Л.Л.²

¹*Одесський національний університет ім. І.І.Мечникова, Одеса, Україна*

²*Одесський центр криміналістичної експертизи, Одеса, Україна*

E-mail: olgaivdan@mail.ru

Вивчено вплив препаратів з іммобілізованими на високовуглеводних препаратах пробіотичними мікроорганізмами на морфометричні показники товстого кішківника, печінки, підшлункової залози щурів з індукованим аллоксаном цукровим діабетом. З'ясовано, що досліджені препарати в умовах аллоксанового діабету, що супроводжується загибеллю β -клітин островків Лангерганса в підшлунковій залозі, позитивно впливають на регенерацію її ендокринної частини, сприяють стимуляції неогенезу островків, в тому числі, через створення фокальних зон. Прийом високовуглеводних препаратів з пробіотичними мікроорганізмами покращує стан товстого кішківника і зменшує токсичний вплив аллоксану на клітини печінки.

Ключові слова: морфометричні показники, аллоксановий діабет, високовуглеводні препарати, пробіотики.

ВСТУП

Діабет є важким метаболічним захворювання, пов'язаним з порушенням усіх видів обміну і, перш за все, вуглеводного обміну. Провідна роль в цьому порушенні належить клітинам печінки, відтворюючим величезний надлишок глюкози, і бета-клітинам підшлункової залози, що синтезують інсулін, ушкодження яких зрештою призводить до поступових змін в усіх метаболічних і транспортних процесах, що беруть участь в обміні глюкози в організмі. Порушуються також функції центральної нервової системи, шлунково-кишкового тракту [1-3].

Метою роботи було дослідження впливу високовуглеводних БАД з пробіотичними мікроорганізмами на морфометричні показники товстого кишечника, печінки, підшлункової залози щурів з індукованим аллоксаном цукровим діабетом.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Дослідження проведено на 120 білих щурах лінії Вістар вагою від 200 до 240 г, які були в умовах віварію ОНУ ім. І.І.Мечникова розміщені у клітинах поодинично. Робота виконана з дотриманням усіх правил і міжнародних рекомендацій Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, використовуваних в

експериментальних роботах.

Тварини були підрозділені на наступні групи: I 1 - інтактні, I 2 - аллоксандіабетичні, II 1 - з введенням до складу раціону бурякового жому (БурЖ), II 2 аллоксандіабетичні з введенням до складу раціону БурЖ, III 1 - з введенням до складу раціону харчових волокон бурякового жому (ХВБурЖ), III 2 - аллоксандіабетичні з введенням до складу раціону ХВБурЖ, IV 1 - з введенням до складу раціону ХВБурЖ з іммобілізованими лактобактеріями (ХВБурЖ+Л), IV 2 аллоксандіабетичні з введенням до складу раціону ХВБурЖ+Л, V 1 з введенням до складу раціону ХВБурЖ з лактобактеріями і біфідобактеріями (ХВБурЖ+Л+Б), V 2 - аллоксандіабетичні з введенням до складу раціону ХВБурЖ+Л+Б.

Алоксановий діабет викликали шляхом внутрішньочеревного введення 5 % розчину алоксангідрату фірми "Хемапол" у кількості 15 мг/ 100 г ваги тварини, що узгоджується із загальноприйнятими методиками індукування діабету.

Для проведення загального гістологічного аналізу шматочки внутрішніх органів (печінки, підшлункової залози, товстої кишки) піддослідних тварин фіксували в розчині нейтрального формаліну з масовою часткою метаналю 12 %. Далі шматочки тканин відмивали і зневоднювали в розчинах етилового спирту зростаючих концентрацій і заливалися в парафін. Зрізи завтовшки 6-7 мкм забарвлювали гематоксилін-еозіном. Безпосередня оцінка готових препаратів проводилася за допомогою бінокулярного мікроскопа [4-9].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що при патогенезі основними органами-мішенями є шлунково-кишковий тракт, печінка, нирки, а при алоксановій токсикації – підшлункова залоза, тому було здійснено гістологічне дослідження саме цих органів. При гістохімічному аналізі слизової оболонки тонкого кишечнику алоксандіабетичних щурів знайдено, що знижується глибина індуляції кишкових ворсин, при прийомі БАД ця величина збільшується. При захворюванні розширяються власні пластинки слизової за рахунок набряку міжклітинної речовини у тварин з діабетом. В групах тварин, що приймали БАД, набряку не спостерігається, лише у тварин групи II 2 відмічено незначне набрякання слизової (рис. 1).

При дослідженні епітеліального шару слизової оболонки товстої кишки у тварин з алоксановим діабетом (група I 2) збільшується кількість бокаловидних клітин і міжепітеліальних лейкоцитів у порівнянні із групою без діабету (I 1), в групах тварин, що отримували БАД, значної різниці у складі клітин слизової оболонки не виявлено (рис. 1). У тварин з діабетом (група I 2) у товстій кищці відмічена незначна деструкція та загибель колоноцитів, що відображає порушення обмінних процесів на клітинному рівні, наявне розширення бокаловидних клітин слизової оболонки товстої кишки і заповнення їх слизовим оболонкам вмістом. Дистрофічні зміни гепатоцитів були частковими, не дуже вираженими. Власна пластинка слизової збільшена в об'ємі, що може бути пов'язано з поліферізацією фібропластів і може бути пояснена відповіддю клітин з'єднувальної клітини на ураження.

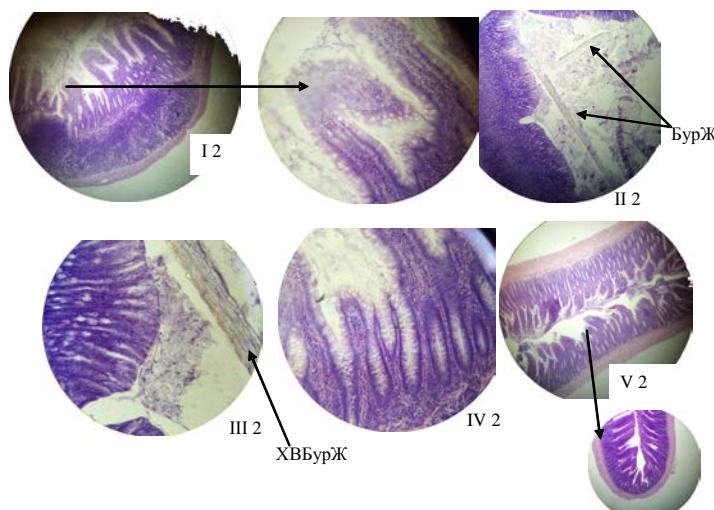


Рис. 1. Гістологічні дослідження товстої кишки у різних груп щурів

При дослідженні епітеліального шару слизової оболонки товстої кишки у тварин з аллоксановим діабетом (група I 2) збільшується кількість бокаловидних клітин і міжепітеліальних лейкоцитів у порівнянні із групою без діабету (I 1), в групах тварин, що отримували БАД, значної різниці у складі клітин слизової оболонки не виявлено (див. рис. 1). У тварин з діабетом (група I 2) у товстій кишці відмічена незначна деструкція та загибель колоноцитів, що відображає порушення обмінних процесів на клітинному рівні, наявне розширення бокаловидних клітин слизової оболонки товстої кишки і заповнення їх слизовим оболонкам вмістом. Дистрофічні зміни гепатоцитів були частковими, не дуже вираженими. Власна пластинка слизової збільшена в об'ємі, що може бути пов'язано з поліферізацією фібропластів і може бути пояснена відповіддю клітин з'єднувальної клітини на ураження. В препаратах, отриманих з товстого кішківника груп IV 2 і V 2 помітно подовження крипт і збільшення кількості бокаловидних клітин, крипти глибокі, тісно прилягають одна до одної, відразу під епітелієм видно світлі бокаловидні клітини із невеликою кількістю слизу. Необхідно відмітити також гіпергенерацію слизу у зразків груп II 2 і III 2, а у групи I 2 наявний як на поверхні слизової оболонки, так і у просвіті кишковика, помітна також жирова тканина, що свідчить про мукоїдоз плівок слизових оболонок.

У препаратах печінки щурів у групах III 2, IV 2, V 2 виявлено збереження балочної будови клітин, межі гепатоцитів виражені слабо (рис. 2), ядра середні або велики з ядерцем. Загальна кількість клітин не зазнавала значних змін в порівнянні з інтактними (I 1), проте, виявлялися дегенеруючі гепатоцити, особливо у групі II 2, у зв'язку з чим кількість нормальніх гепатоцитів була меншою. У дегенеруючих гепатоцитів зустрічалися гіперхромні ядра неправильної форми (каріопікноз), у

деяких клітин ядро було відсутнє, особливо це стосується групи I 2 і частково II 2. У більшості клітин цитоплазма рихла з невеликими вакуолями.

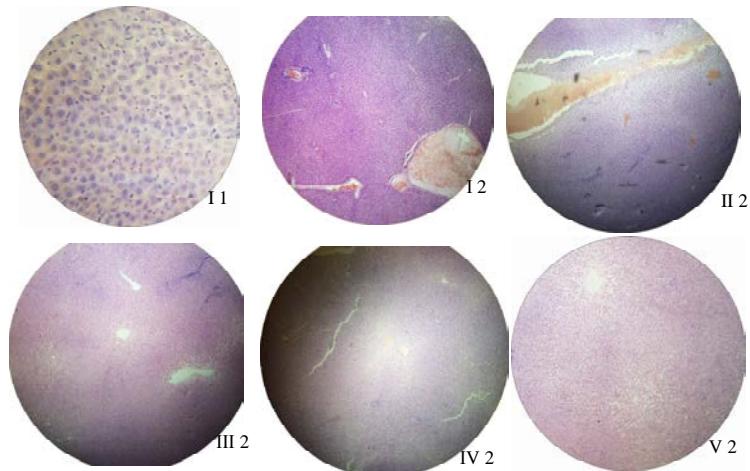


Рис. 2. Гістологічні дослідження печінки у різних груп щурів

Дистрофічні зміни гепатоцитів в групах III 2, IV 2, V 2 незначні, зберігся радіальний рисунок печінкових часточок, у зразку групи III 2 трохи розширені капіляри, повнокровні, серед гепатоцитів зустрічаються двоядерні клітини.

Морфометричне дослідження підшлункової залози у здорових тварин (рис. 3) показало, що значних відмінностей немає, а у тварин з аллоксановим діабетом, що отримували БАД з пробіотичними мікроорганізмами виявлено тенденцію до збільшення відносного об'єму островів підшлункової залози через два тижні після індукування діабету, що може бути пов'язано не тільки зі зміною характеру їх розподілу залежно від розміру: збільшенням кількості більших і зменшенням кількості дрібніших островів, але й тенденцією до відновлення пошкоджених тканин. При цьому їх чисельна щільність не відрізнялася значною мірою від контролю без діабету. При морфологічному дослідженні в інтактній групі відзначалася альвеолярно-трубчаста будова екзокринної частини підшлункової залози з чітким розподілом на часточки прошарками сполучної тканини.

Морфометричне дослідження підшлункової залози у тварин з діабетом у порівнянні із здоровими тваринами виявило тенденцію до збільшення відносного об'єму островків Лангерганса підшлункової залози у тварин, що отримували БАД. Це може бути пов'язано із змінами характеру їх розподілу в залежності від розмірів, тобто збільшенням кількості більш великих у групі на ХВБурЖ та відновленням і створенням нових у групах на БАД з пробіотичними мікроорганізмами. У групи з аллоксановим діабетом на БурЖ швидше руйнувалися островки меншого розміру і перерозподіл може бути пояснений саме цим.

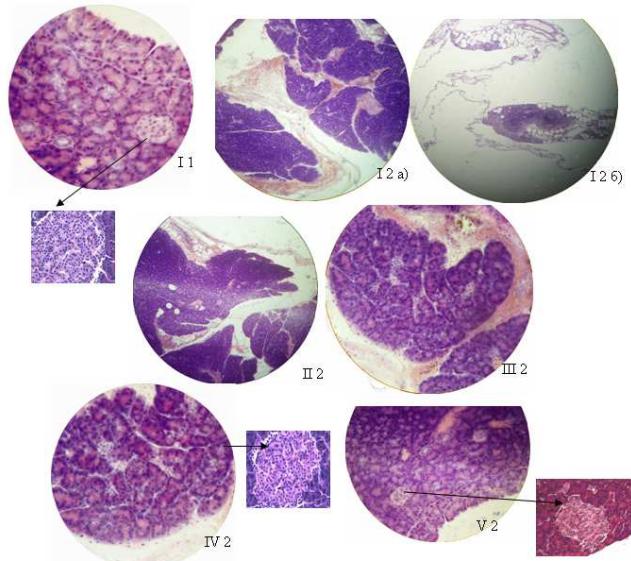


Рис. 3. Гістологічний стан підшлункової залози аллоксандіабетичних щурів у порівнянні із інтактними тваринами

При мікроскопічному дослідженні підшлункової залози групи I 2 в центральній зоні островків спостерігали гіпертрофовані ендокринні клітини, розширення кровоносних капілярів. В окремих зразках клітини підшлункової залози замінялися на з'єднувальну тканину (див. рис. 3 група I 2 б). Таким чином, морфологічні дані вказують на підвищення функціональної активності ендокринної частини підшлункової залози. На початковому етапі помірна гіперглікемія є одним із основних стимулів підвищення функціональної активності і розмноження β -клітин островків Лангерганса [4, 8, 9].

При морфологічному дослідженні в інтактній групі I 1 відзначалася альвеолярно-трубчаста будова екзокринної частини підшлункової залози з чітким розподілом на часточки прошарками сполучної тканини. Екзокріноцити зберігали полярне диференціювання при формуванні ацинусів. Міжчасточкові вивідні протоки вистелені одношаровим кубічним епітелієм. Панкреатичні острівці мали округлу або овальну форму і розташовувалися поодинці поблизу внутрішньочасточкових вивідних проток.

При мікроскопічному дослідженні підшлункової залози в центральній зоні острівців спостерігали гіпертрофовані ендокринні клітини, розширені кровоносні капіляри. Таким чином, морфологічні дані вказують на підвищення функціональної активності ендокринній частині підшлункової залози.

Панкреатичні острівці мали округлу або овальну форму і розташовувалися поодинці поблизу внутрішньо часточкових вивідних проток. Об'ємна доля острівців, розташованих в шлунковій і селезінковій зонах майже в два рази перевищувала об'ємну долю острівців кишкової зони.

У щурів з групи I 2 визначався набряк міжчасточкової сполучної тканини. У панкреатичних острівцях відзначалася помірна лімфоцитарна інфільтрація. Капіляри острівців були різко повнокровні, ендокриноцити, розташовані в центральних зонах були некротизовані, а розташовані в периферичних відділах острівця гіпертрофовані.

Об'ємна доля острівців, розташованих в кишковій, шлунковій і селезінковій зонах, зменшувалася в порівнянні з інтактною контрольною групою. Відбувалося значне зменшення площин, займаної β -ендокриноцитами, в усіх зонах підшлункової залози групи I 2 в порівнянні з контрольною інфільтрацією тварин, відзначалася помірна експресія чинників проліферації в гіпертрофованих клітинах острівців Лангерганса.

В той же час, у тварин груп III 2, IV 2, V 2 в панкреатичних острівцях відзначалася помірна лімфоцитарна інфільтрація, повнокров'я капілярів, деструкція окремих ендокриноцитів. Центральні і периферичні відділи острівців займали β -клітини. Визначалися дрібні острівці, які розташовувалися в тісному зв'язку з внутрішньочасточковими вивідними протоками. Визначалася помірно виражена гіпертрофія β -ендокриноцитів. Об'ємна доля острівців кишкової, шлункової і селезінкової зон збільшувалася в порівнянні з групою I 2, проте не досягала показників інфільтрації контрольної групи I 1.

Найменша кількість і найбільш дрібні островки були в групі II 2, яка була близьче за загальним виглядом препаратів до групи I 2, ніж до групи III 2, в якій руйнування β -клітин були більшими, ніж у груп IV 2, V 2.

У щурів з діабетом визначався набряк міжчасточкової з'єднувальної тканини. У панкреатичних острівцях відзначалася помірна лімфоцитарна інфільтрація. Капіляри острівців були різко повнокровні, ендокріноцити, розташовані в центральних зонах, були некротизовані, а розташовані в периферичних відділах острівця гіпертрофовані. Об'ємна доля острівців, розташованих в кишковій, шлунковій і селезінковій зонах зменшувалася в порівнянні з інфільтрацією контрольної групою.

При електронно-мікроскопічному дослідженні у більшості інсулозитів, що мали неправильну форму, різко вакуолізований цитоплазму з нерівномірним розподілом в ній органел, візуалізувалися набряклі мітохондрії, каріопікноз, фрагменти зруйнованої гранулярної ендоплазматичної мережі і комплексу Гольджі, секреторні гранули не визначалися або були одиничні. Секреторні гранули розташовувалися хаотично як навколо ядра, так і плазмолемі у вигляді одиничних скupчень. Їх електронно-щільна серцевина ставала більшою в порівнянні з групою інфільтрації тварин, а світлий аморфний обідок зменшувався.

В групах щурів з ЦД, що отримували БАД – III 2, IV 2 і V 2 в панкреатичних острівцях відзначалася помірна лімфоцитарна інфільтрація, повнокров'я капілярів, деструкція окремих ендокриноцитів. Центральні і периферичні відділи острівців займали β -клітини. Визначалися дрібні острівці, які розташовувалися в тісному зв'язку з внутрішньочасточковими вивідними протоками.

У підшлунковій залозі груп IV 2 і V 2 визначалася помірно виражена гіпертрофія β -ендокриноцитів. Об'ємна доля острівців кишкової, шлункової і селезінкової зон збільшувалася в порівнянні з ЦД, проте не досягала показників інфільтрації контрольної групи.

групи I 1 та груп без діабету, що отримували БАД. Збільшувалася площа, займана інсулін-позитивними клітинами в усіх зонах підшлункової залози в порівнянні з групою I 2. Кількість β -клітин в стані апоптозу у груп IV 2 і V 2 в порівнянні з тваринами групи I 2 достовірно зменшувалася. Що стосується аллоксандіабетичних тварин, що отримували раціон II 2, значних відмінностей при морфологічному дослідженні підшлункової залози від тварин групи I 2 не відмічено.

Повільне оновлення клітинної популяції в підшлунковій залозі щурів групи I 2 виражається низьким індексом проліферації ендокриноцитів островців Лангерганса, що узгоджується з літературними даними [8-12]. Збільшення проліферації при ЦД можна пояснити активацією репаративних процесів ендокринної частини підшлункової залози.

Структурна адаптація ендокринної частини підшлункової залози до навантаження, що збільшується при розвитку діабету до важкої форми, в умовах підвищеного вуглеводного обміну, як правило, відбувається за рахунок підвищення об'єму островків, що залишилися неушкодженими, що обумовлено проліферацією і гіпертрофією β -клітин. Але кількість таких клітин при важкій формі діабету невпинно зменшується, а нові клітини не утворюються.

У щурів з аллоксановим діабетом групи I 2 у підшлунковій залозі було виявлено зменшення кількості фокальних зон через три тижні в два рази. При мікроскопічному дослідженні підшлункової залози в центральній зоні островців спостерігали гіпертрофовані ендокринні клітини, розширені кровоносні капіляри. Таким чином, морфологічні дані вказують на підвищення функціональної активності ендокринній частині підшлункової залози.

У щурів груп III 2, IV 2, V 2 відносний об'єм островків Лангерганса та їх чисельна щільність статистично значимо перевищувала групу тварин I 2. При аллоксановому діабеті на фоні прийому БАД утворення фокальних зон в підшлунковій залозі супроводжувалося збільшенням кількості островків Лангерганса. Динаміка змін їх розмірів свідчить про подальший ріст і розвиток новостворених островків.

Поступово відбувалося повільне оновлення клітинної популяції β -клітин, найбільш виражене в групах IV 2, V 2. З експериментальних даних виходить, що БАД із пробіотичними мікроорганізмами мають виражену стимулюючу дію на процеси клітинної репарації.

Таким чином, можна зробити висновок, що використання у складі раціонів таких БАД, як ХВБурЖ, ХВБурЖ+Л, ХВБурЖ+Л+Б дозволяє певним чином зменшити токсичний сплив аллоксану та здатні виявляти певну стимулюючу дію на процеси клітинної репарації.

Зміни, що виявлені при морфологічних дослідженнях, відбувають основні стадії морфогенезу ЦД і свідчать про адекватність використовуваної експериментальної моделі цукрового діабету, а у аллоксандіабетичних тварин, що отримували БАД, на тлі характерних для цього захворювання структурних змін в ендокринній частині підшлункової залози виявлені особливості патоморфоза, що проявлялися в посиленні репаративної регенерації β -інсулоцитів і зменшенні кількості

безповоротно пошкоджених β -клітин, що знаходяться в стані апоптозу, що виявлені завдяки електронно-мікроскопічному дослідженю.

В умовах моделювання ЦД виявлені комплексні структурні зміни в острівках підшлункової залози, які відбувають основні стадії морфогенезу цього захворювання. Зменшення кількості β -клітин і їх секреторних гранул, об'ємної долі острівців на фоні помірно вираженого інсулюту і появи патогномонічних ознак ЦК свідчить про адекватність використовуваної експериментальної моделі. У шурів з ЦД, що отримували препарат БАД, виявлено посилення репаративної регенерації інсулоцитів і зменшення числа клітин, що піддалися апоптозу.

У літературі останніх років активно обговорюються і інші шляхи збільшення об'єму ендокринної паренхіми підшлункової залози у дорослих тварин, зокрема, неогенез β -клітин з камбіальних елементів — стовбурових, напівстовбурових клітин і клітин-попередників [4, 10]. A. Lechner, J.F. Habener [9] розрізняють неогенез окремих β -клітин, що утворюються із стовбурових клітин, які знаходяться усередині існуючих острівців, і неогенез острівців із стовбурових клітин, що локалізуються в стінці проток. Перший з вказаних процесів має місце вже через 23 дні після стимуляції, а для реалізації другого вимагається близько 40 днів. S. Bonner – Weir із співавторами [8] виявили в підшлунковій залозі дорослих шурів після часткової панкреатектомії так звані фокальні зони, що є ділянками тканини підшлункової залози, що складаються з безлічі дрібних проток з високим рівнем проліферативної активності епітеліальних клітин. Фокальна зона є транзиторною структурою, яка може диференціюватися як в острівці Лангерганса, так і у ацинуси з формуванням нових часточок підшлункової залози, що структурно не відрізняються від вже існуючих. Автори розглядають цей шлях регенерації у дорослих тварин як рекапітуляцію ембріонального розвитку підшлункової залози. M. Lipsett, D.T. Finegood [13] на моделі пролонгованої гіперглікемії, викликаної внутрішньовенним введенням 50 % розчину глюкози мишам, отримали результати, формування фокальних зон, що свідчать про можливість їх утворення з малодиференційованих клітин ацинусів. У цьому і інших дослідженнях [14-17] звертають на себе увагу дані про інфільтрацію тканини підшлункової залози лімфоїдними клітинами, що передують утворенню фокальних зон. Висловлюється думка, що цитокіни і чинники росту, що продукуються імунокомпетентними клітинами, можуть впливати на напрям диференціювання фокальних зон — у бік ендокринної або езокринної паренхіми.

Відомо, що лактобактерії мають модулюючу дію на імунні функції організму — підвищують активність лімфоїдної тканини, посилюють реакції клітинного і гуморального імунітету, стимулюють продукцію цитокінів [12]. Структурні зміни в підшлунковій залозі тварин груп IV 2, V 2, виявлені в результаті експерименту, могли бути обумовлені регуляторними впливами лімфоїдних клітин на морфогенетичні процеси в підшлунковій залозі.

У груп з діабетом, що приймали БАД, (ІІІ 2, IV 2, V 2) фокальні зони мали різну міру диференціювання: від недиференційованих, що складаються тільки з дрібних проток, до більше просунутих, які включають ендокринні структури у вигляді скupчень островкових клітин або сформованих островків, і ацинуси, іноді і обидва види клітин разом. Наявність фокальних зон в підшлунковій залозі в нормальніх

умовах життєдіяльності може бути пов'язана з природними процесами оновлення тканини підшлункової залози. За сучасними уявленнями β -клітини підшлункової залози не є статичною популяцією, їх загальна кількість і індивідуальні розміри можуть зростати і зменшуватися для підтримки рівня глюкози в межах вузьких фізіологічних меж [8, 10].

При аналізі зрізів підшлункової залози у тварин груп IV 2, V 2, особливо при профілактичному годуванні БАД, фокальні зони на початку майже не помітні, а після 4-х тижнів годування БАД з аллоксановим діабетом вони вже наявні в підшлунковій залозі. Розміри їх варіювали в тих же межах, що і в контролі — від 0,04 до 0,14 мм^2 .

Слід зазначити, що утворення фокальних зон у тварин з діабетом без профілактичного годування не супроводжувалося збільшенням кількості острівців, в тому числі і дрібних новоутворених. Наявність чи відсутність фокальних зон в різних моделях та на різних термінах прийому БАД, можливо, відбиває структурно-функціональну динамічність підшлункової залози у фізіологічних умовах життєдіяльності.

Таким чином, результати проведеного дослідження показали, що в умовах аллоксанового діабету, що супроводжується загибеллю β -клітин островків Лангерганса в підшлунковій залозі, прийом високо вуглеводних препаратів з пробіотичними мікроорганізмами позитивно впливає на регенерацію її ендокринної частини, сприяє стимуляції неогенезу островків, в тому числі, через створення фокальних зон.

ВИСНОВКИ

1. При моделі аллоксанового діабету препарати з введенням пробіотичних мікроорганізмів дозволяють певним чином зменшити токсичний сплив аллоксану та здатні виявляти певну стимулюючу дію на процеси клітинної репарації.
2. У тварин з аллоксановим діабетом, що отримували препарати з пробіотичними мікроорганізмами виявлено тенденцію до збільшення відносного об'єму острівців підшлункової залози і тенденцією до відновлення пошкоджених тканин.
3. На підставі проведених досліджень можна стверджувати, що всі вивчені препарати з пробіотичними мікроорганізмами покращують стан товстого кішківника і зменшують токсичний вплив аллоксану на клітини печінки, тому доцільним є їх використання при порушеннях обмінних процесів і для зменшення впливу хімічних токсикантів.

Список літератури

1. Біохімія / [Алейникова Т.Л., Авдеєва Л.В., Андрианова Л.Е. и др.]; под. ред.. Северина Е.С. – М.: ГЭОТАР-Медіа, 2006. – 784 с.
2. Губський Ю.І. Біологічна хімія: Підручник. - Київ-Тернопіль: Укрмедкнига, 2000 - 508 с.
3. Біологічна хімія / [Підручник / Вороніна Л.М., Десенко В.Ф., Мадієвська Н.М. та ін.]; за ред. Вороніної Л.М. – Х.: Основа; Видавництво НФАУ, 2000. – 608 с. Bonner - Weir S. A second pathway for regeneration of adult endocrine pancreas. A possible recapitulation of embryonic development / S. Bonner - Weir, L.A. Baxter, G.T. Schuppin, F.E. Smith // Diabetes. — 1993. — Vol. 42. — № 12. — P. 1715-1720.
4. Обухова Л.А. Влияние длительного приема пробиотика на морфофункциональное состояние стан эндокринной части поджелудочной железы у экспериментальных животных с аллоксановым диабетом

- / Обухова Л.А., Дружинина Ю.Г., Пальчикова Н.А., Калмыкова А.И., Селятицкая В. Г. // Бюл. РАМН. – 2006. - №2 (120). – С. 171-175.
5. Сакута Г.А. Клеточные механизмы регенерации цирротически измененной печени крыс II Влияние частичной гепатэктомии на пролиферацию, полиплоидизацию и гипертрофию гепатоцитов / Сакута Г.А., Кудрявцев Б.Н. // Цитология. – 2005. – Т 47, № 5. – С. 379-387.
 6. Protective effect of aminoguanidine, a nitric oxide synthase inhibitor, against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in mice/Al-Shabanah O. A., Alam K., Nagi M. N., Al-Rikabi A. C., Al-Bekairi A. M. // Life Sci. - 2000. -V. 66, № 3. -P. 265-270
 7. Гвозденко Т.А. Роль антиоксидантных ферментов и антиоксиданта пробукола в антирадикальной защите бета-клеток поджелудочной железы при аллоксановом диабете / Гвозденко Т.А. // Медицинская экология. - 2005.-№ 1. - С.23-26
 8. Bonner - Weir S. Perspective: Postnatal pancreatic β -cell growth / S. Bonner - Weir // Endocrinology. – 2000. – Vol. 141, № 6. – P. 1926-1929.
 9. Leichner, A. Stem Progenitor cells derived from adult tissues: potential for the treatment of diabetes mellitus /A. Leichner, J.F.Habener // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. – 2003. – Vol. 284, № 2. – P. 259-266.
 10. Bouwens, L. Regulation of pancreatic betacell mass / L. Bouwens, I. Roodman // Physiol. Rev. — 2005. — Vol. 85. — № 4. — P. 1255-1270
 11. Lipsett, M. β -cell neogenesis during prolonged hyperglycemia in rats / M. Lipsett, D.T. Finegood // Diabetes. – 2002. – Vol. 51, № 6. – P 1834-1841.
 12. Nikolaeva T.N. Иммуностимулирующая и антиканцерогенная активность нормальной лактофлоры кишечника / Т.Н. Николаева, В.В. Зорина, В.М. Бондаренко // Терапевтическая гастроэнтерология. — 2004. — № 4. — С. 39-44.
 13. Lipsett, M. β -cell neogenesis during prolonged hyperglycemia in rats / M. Lipsett, D.T. Finegood // Diabetes. – 2002. – Vol. 51, № 6. – P 1834-1841.
 14. Полунина Т.Е. Патология желудочно-кишечного тракта при сахарном диабете/ [Текст, електронний ресурс] Т.Е. Полунина // «Эффективная Фармакотерапия. Гастроэнтерология». - 2011. - № 5. – С. 12-18 режим доступу: <http://medi.ru/doc/171209.htm>
 15. Шемедюк Н.П. Гістологічні зміни селезінки, печінки, нирок тварин за дії біоактивних комплексів /Н.П. Шемедюк, О.О. Зайцев, В.І. Буцяк // Современные проблемы токсикологии. – 2010. - № 2-3. – С. 54-57.
 16. Bock T. Increased islet volume but unchanged islet number in ob/ob mice / T. Bock, B. Pakkenberg, K. Buschard // Diabetes. — 2003. — Vol. 52. — № 7. — P. 1716-1722.
 17. Bouwens, L. Regulation of pancreatic betacell mass / L. Bouwens, I. Roodman // Physiol. Rev. — 2005. — Vol. 85. — № 4. — P. 1255-1270.

Данилова А.О. Изучение влияния препаратов с пробиотическими микроорганизмами на морфометрические показатели толстого кишечника, печени, поджелудочной железы крыс с аллоксановым диабетом / А.О. Данилова, А.В. Запорожченко, Л.Л.Большаков // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2012. – Т. 25 (64), № 3. – С.31-41.

Изучено влияние препаратов с иммобилизованными на высокоуглеводных препаратах микроорганизмами пробиотиков на морфометрические показатели толстого кишечника, печени, поджелудочной железы крыс с индуцированным аллоксаном сахарным диабетом. Выяснено, что исследованные препараты в условиях аллоксанового диабета, который сопровождается гибеллю β -клеток островков Лангерганса в поджелудочной железе, положительно влияют на регенерацию ее эндокринной части, способствуют стимуляции неогенеза островков, в том числе, через создание фокальных зон. Прием высокоуглеводных препаратов с пробиотическими микроорганизмами улучшает состояние толстого кишечника и уменьшает токсичное влияние аллоксана на клетки печени.

Ключевые слова: морфометрические показатели, аллоксановый диабет, высокоуглеводные препараты, пробиотики.

Danilova A.O. Study of the effect of drugs with probiotic microorganisms on morphometric parameters of the large intestine, liver and pancreas of rats with alloxan diabetes / A.O. Danilova, AV. Zaporozchenko, L.L. Bolshakov // Scientific Notes of Taurida V. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No. 3. – P. 31-41.

The effect of drugs with probiotic microorganisms, which was immobilized on a high carbohydrate preparations, on morphometric parameters of the large intestine, liver, pancreas of rats with induced alloxan diabetes have been studied. It was found that the studied drugs in conditions of alloxan diabetes, which is accompanied by a loss of β -cells of the islets of Langerhans in the pancreas, positive impact on the regeneration of its endocrine and contribute to the stimulation of islet neogenesis, including through the creation of focal zones. Receiving high carbohydrate preparations with probiotic microorganisms improves the colon and reduces the toxic effect of alloxan on the liver cells.

Keywords: morphometric parameters, alloxan diabetes, high carbohydrate preparations, probiotics.

Поступила в редакцію 14.09.2012 г.

УДК 577.112:612

СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ ГЕМОГЛОБИНА В ЭРИТРОЦИТАХ БОЛЬНЫХ ЭРИТРОЕМИЕЙ

Ёлкина Н.М.

*Крымский факультет Запорожского национального университета, Симферополь, Украина
E-mail: Yolkina@com.ua*

Установлено, что повышение содержания общего гемоглобина в эритроцитах больных эритроемией сопровождается резким увеличением уровня метгемоглобина (в 4,47 раз по сравнению с контрольной группой доноров). При этом по отношению к метгемоглобину процентная доля гликозилированной формы гемоглобина в эритроцитах больных в 5 раз меньше, чем в контрольной группе.

Ключевые слова: эритроциты, гемоглобин, метгемоглобин, гликозилированный гемоглобин, эритроемия.

ВВЕДЕНИЕ

Изучение молекулярных основ различных заболеваний и патологических состояний организма человека является одной из актуальных проблем современной медицины и биологии. Ранее [1-4] было показано, что при некоторых заболеваниях, сопровождающихся развитием окислительного стресса, в патологический процесс вовлекаются эритроциты, о чем свидетельствует изменение показателей внутриэритроцитарного метаболизма и активности отдельных эритроцитарных ферментов. Самостоятельный интерес представляет выяснение биохимического состояния эритроцитов при гематологических заболеваниях, в частности тех, которые имеют онкологический характер.

В связи с этим, целью настоящей работы являлось изучение количественного соотношения различных форм гемоглобина при эритроемии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований служили эритроциты практически здоровых людей (20 человек) – доноров станции переливания крови г. Симферополя и больных эритроемией (11 человек мужского и женского пола, средний возраст обследованных – 59 лет). Кровь больных брали на базе Крымского онкологического центра. Эритроциты гемолизировали по методу Драбкина [5]. В гемолизатах эритроцитов определяли содержание общего гемоглобина [6], метгемоглобина [6] и гликозилированной формы гемоглобина [7]. Были использованы спектрофотометрические методы количественного анализа. Полученные данные обрабатывали статистически с использованием t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали результаты исследований, содержание общего гемоглобина в эритроцитах больных эритроемией в среднем составляет 174 г/л, что на 40,3% больше по сравнению с контрольной группой доноров (таблица). Вместе с этим, наблюдается существенное увеличение уровня метгемоглобина. В эритроцитах больных эритроемией содержание метгемоглобина было в 4,47 раза выше по сравнению с практически здоровыми людьми. Прослеживается высокий уровень корреляции между содержанием общего гемоглобина и метгемоглобина ($r = +0,95$).

Таблица

Содержание общего гемоглобина (Hb_{tot}), метгемоглобина (MtHb) и гликозилированного гемоглобина (glyc.Hb) в гемолизатах эритроцитов больных эритроемией ($M \pm m$); соотношение процентных долей гликозилированного гемоглобина и метгемоглобина (glyc.Hb/MtHb)

Обследованные группы	Hb_{tot} , г/л	MtHb, %	glyc.Hb, %	$\frac{glyc.Hb}{MtHb}$
Контрольная группа доноров	$124 \pm 2,35$	$2,5 \pm 0,30$	$3,9 \pm 0,30$	1,56
Больные эритроемией	$174 \pm 3,07^*$	$11,18 \pm 0,75^*$	$3,49 \pm 0,40$	0,31

Примечание: * – достоверность различия показателей по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

Из литературы известно [8], что переход гемоглобина в метформу, обусловленный окислением железа гема ($Fe^{+2} \rightarrow Fe^{+3}$), сопровождается образованием супероксидиона, инициирующего последующие цепные реакции генерирования активных форм кислорода (АФК) как радикальной, так и нерадикальной природы.

Резкое увеличение содержания метгемоглобина при эритроемии может свидетельствовать об усиленном протекании в эритроцитах окислительных реакций с участием АФК и о возможности развития в организме больных острого окислительного стресса.

Содержание гликозилированного гемоглобина в эритроцитах больных было, в среднем, на 10,5% ниже, чем в контрольной группе. Однако, эти различия имели характер тенденции, что свидетельствует о возможности стабилизации уровня гликозилированной формы гемоглобина при эритроемии. Вместе с этим, по отношению к метгемоглобину процентная доля гликозилированной формы гемоглобина в группе больных была в 5 раз меньше по сравнению с контрольной группой доноров.

Известно, что гликозилированный гемоглобин проявляет в 10 раз более высокое сродство к кислороду [9] и, в связи с этим, соотношение различных форм гемоглобина имеет существенное значение для выполнения системой гемоглобина кислородо-транспортной функции.

ВЫВОДЫ

- Повышение содержания общего гемоглобина в эритроцитах больных эритроемией сопровождается резким увеличением уровня метгемоглобина, что

- свидетельствует об усиленном протекании в эритроцитах окислительных реакций с участием АФК и о возможности развития в организме окислительного стресса.
2. Отмеченные изменения в процентном соотношении гликозилированной формы и функционально инертной метформы гемоглобина могут существенно влиять на эффективность кислородо-транспортной функции гемоглобина при данной патологии.

Список литературы

1. Состояние антиоксидантной системы эритроцитов при циррозе печени / С.В. Коношенко, В.В. Казакова, Н.М. Ёлкина [и др.] // Таврический медико-биологический вестник. – 2009. – Т. 12, № 3 (47). – С. 34-36.
2. Характеристика отдельных биохимических показателей эритроцитов человека при кардиомиопатии / С.В. Коношенко, Илиас Шашуа, В.А. Ивашов [и др.] // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского, серия: «Биология, химия». – 2010. – Т. 23 (62), № 1. – С. 48-51.
3. Энзиматическая активность эритроцитов человека при ишемической болезни сердца в условиях развития окислительного стресса / Н.М. Ёлкина, С.В. Коношенко, Илиас Шашуа [и др.] // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского, серия: «Биология, химия». – 2011. – Т. 24 (63), № 2. – С. 124-128.
4. Характер изменения показателей обмена глюкозы в эритроцитах в зависимости от вида патологии / Н.М. Ёлкина, В.В. Казакова, Илиас Шашуа [и др.] // Таврический медико-биологический вестник – 2011. – Т. 14, № 4, ч. 2 (56). – С. 66-68.
5. 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.
6. Кушаковский М.С. Метгемоглобинемии / М.С. Кушаковский – М.: Медицина, 1970. – С. 423-427.
7. Данилова Л.А. Колориметрический метод определения гликозилированных гемоглобинов / Л.А. Данилова, Н.И. Лопатина // Лаб. дело. – 1986. – № 5. – С. 281-283.
8. Активность супероксиддисмутазы и содержание метгемоглобина в эритроцитах человека и животных / Е.Е. Дубинина, Л.А. Данилова, Л.Ф. Ефимова [и др.] // Журн. эволюционной физиологии и биохимии. – 1988. – Т. 24, вып. 4. – С. 542-568.
9. Гликозилированные протеины / [Галенок В.А., Боднар П.Н., Диккер В.Е., Ромашкан С.В.]. – Новосибирск: Наука, 1989. – 256 с. – (Монография, посвященная механизму гликозилирования белков).

Йолкіна Н.М. Стан системи гемоглобіну в еритроцитах хворих на еритроемію / Н.М. Йолкіна // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2012. – Т. 25 (64), № 3. – С. 42-44.

Встановлено, що підвищення вмісту загального гемоглобіну в еритроцитах хворих на еритроемію супроводжується значним збільшенням рівня метгемоглобіну (у 4,47 разів порівняно із контрольною групою). Водночас, по відношенню до метгемоглобіну процентна доля глікозильованої форми гемоглобіну в еритроцитах хворих у 5 разів менша ніж у контрольній групі.

Ключові слова: еритроцити, гемоглобін, метгемоглобін, глікозильований гемоглобін, еритроемія.

Yolkina N.M. The state of hemoglobin's system in erythrocytes of patients with erythroemia / N.M. Yolkina // Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No 3. – P. 42-44.

It has been shown, that rising of the content of total hemoglobin in erythrocytes of patients with erythroemia is connected with essential increase of the level of methemoglobin (347,2% higher than in control group). At the same time, the percentage part of glycosilated hemoglobin relatively to methemoglobin in erythrocytes of ills was 403,2 percentage less as compare with control group.

Keywords: erythrocytes, hemoglobin, methemoglobin, glycosilated hemoglobin, erythroemia.

Поступила в редакцию 14.09.2012 г.

Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского
Серия «Биология, химия». Том 25 (64). 2012. № 3. С. 45-51.

УДК 712.4 (477.75)

ПРОЕКТНЫЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ ПО ОЗЕЛЕНЕНИЮ ТЕРРАСИРОВАННОГО СКЛОНА НА ТЕРРИТОРИИ ПАРТЕРНОГО СКВЕРА ДВОРЦА КУЛЬТУРЫ ПРОФСОЮЗОВ В Г. СИМФЕРОПОЛЬ

Зильберварг И.Р., Зильберварг Е.В., Песковец С.А.

*Южный филиал Национального университета биоресурсов и природопользования Украины
«Крымский агротехнологический университет», Симферополь, Украина
E-mail: zironika07@rambler.ru*

Дана характеристика пространственной организации, приведены результаты инвентаризации насаждений, разработаны рекомендации по озеленению террасированного склона на территории партерного сквера Дворца культуры профсоюзов в Симферополе.

Ключевые слова: террасированный склон, озеленение, инвентаризация зеленых насаждений.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время остро стоит проблема реконструкции озеленения города Симферополя. За последние годы, озелененные территории многих культурных и образовательных учреждений подверглись деградации в результате недостаточного ухода и жесткой эксплуатации. Негативное влияние на растения оказали и климатические условия, особенно последние несколько лет.

Территория партерного сквера перед Дворцом культуры профсоюзов одна из самых запущенных, требует комплексной реконструкции. Она сильно пострадала из-за размещения здесь книжного рынка.

Одним из участков, которые требуют реконструкции в первую очередь, является террасированный склон, находящийся со стороны ул. Троллейбусной. Этот участок позволяет разнообразить ландшафт территории и имеет большое значение для пространственной организации партерного сквера, а также для защиты территории от шума и пыли, ограничивая всю территорию от проезжей части.

При проектировании участков с перепадами высот наиболее рациональным решением считается создание террас, подпорных стенок, лестниц. Линии границ в этом случае выделяют невысокими растениями – стелющимися и почвопокровными кустарниками, травянистыми многолетниками, а также растениями с компактной формой кроны. Наряду с террасированием, озеленение – один из наиболее эффективных способов укрепления таких склонов. Создавая террасы с подпорными стенками, также разграничивают, визуально расширяют пространство, придавая ландшафту разнообразие [1].

Цель данной работы – разработать рекомендации по озеленению террасированного склона на территории партерного сквера Дворца культуры

профсоюзов. В задачи исследований входили следующие вопросы: инвентаризация существующих насаждений озелененной территории Дворца культуры профсоюзов, общая оценка объемно-пространственной организации террасированного склона, подбор ассортимента растений для озеленения террасированного склона.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Инвентаризационные работы проводились с апреля по октябрь 2011 года в соответствии с Инструкцией по технической инвентаризации зеленых насаждений в городах и поселках городского типа Украины [2]. Номенклатура древесных и кустарниковых пород приведена по стандартным источникам [3]. Подбор древесно-кустарниковых пород для создания растительных групп на террасированном склоне осуществлялся на основании рекомендаций специалистов, с учетом всех факторов и условий произрастания [1, 4].

Исследования проводились на территории партерного сквера Дворца культуры профсоюзов в г. Симферополь.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Результаты инвентаризации озелененной территории

Зеленые насаждения территории Дворца культуры профсоюзов являются частью структуры комплексной зеленой зоны города – представляют собой своеобразный зеленый коридор, между площадями Московской и им. Куйбышева.

Дворец культуры профсоюзов создавался на участке с уже имеющейся окружающей жилой застройкой и прилегающим зеленым массивом, он тесно связан с селитебной частью города и, следовательно, не имеет возможностей для расширения.

На данном объекте рельеф преимущественно равнинный, с уклоном в северо-западном направлении достигающим 7 %. Главные вертикальные и объемные акценты образованы древесной растительностью. Объемно-пространственное разнообразие территории формируется с помощью закрытых, полуоткрытых массивов, рядовых посадок, открытых пространств партера. Инертность территории данного участка слегка нивелируется путем выявления уклонов местности – созданием подпорных стенок, лестничных пролетов.

Дорожно-тропиночная сеть партерного сквера Дворца культуры профсоюзов спланирована регулярно, все элементы ее симметричны и имеют строгие геометрические формы. Дорожки радиально расходятся от площади перед зданием к периферии объекта, образуя так называемые лучи. Между ними расположены симметричные модули с растительными элементами. Растения в них высажены пейзажно, смягчают строгую симметрию.

Группы из хвойных растений, расположенные непосредственно перед главным входом во Дворец, придают зданию торжественность, официальность. Как дополнительный элемент, подчеркивающий эти же функции, выступают цветники, которые в настоящее время находятся в неудовлетворительном состоянии.

Растительные композиции, расположенные по краям участка, смягчают впечатление официальности объекта, позволяют гармонично вписать его в окружающий ландшафт. В них преобладают листопадные деревья и кустарники.

Для укрепления склона со стороны ул. Троллейбусной созданы подпорные стенки с пандусами и лестницами. Террасированный склон практически не озеленен, ограничен только от проезжей части рядовой посадкой тополя черного.

Инвентаризация зеленых насаждений, проведенная на всей территории исследуемого объекта, показала, что там произрастает 818 экземпляров древесно-кустарниковой растительности. Из них 91 экземпляр хвойных растений, 727 лиственных, включая 63 кустарника. На террасированном склоне произрастает 3 всего 3 вида древесно-кустарниковых растений лиственных пород.

Флора объекта представлена в основном интродуцентами. Наиболее декоративными являются: альбиция ленкоранская (*Albizia julibrissin* Duraz.), слива Писсарда (*Prunus Pissardii* Carr.), кедр атласский (*Cedrus atlantica* Manetti), церцис европейский (*Cercis siliquastrum* L.), миндаль обыкновенный (*Amygdalus communis* L.) – они выступают в качестве солитеров и играют роль акцентных растений в растительных группировках. Среди аборигенов особое внимание привлекают тис ягодный (*Taxus baccata* L.), сосна черная подвид крымская (*Pinus nigra* subsp. *pallasiana* D. Don.), можжевельник казацкий (*Juniperus sabina* L.).

Несмотря на хорошее состояние деревьев и кустарников, элементы благоустройства, газоны и цветники партерного сквера требуют реконструкции.

2. Предложения по реконструкции озеленения террасированного склона

Террасированный склон, ограничивающий территорию партерного сквера, не отвечает требованиям, предъявляемым к таким объектам ландшафта и рекомендациям ведущих специалистов в области ландшафтной архитектуры, озеленен слабо, подвержен смыву грунта. Перепады высот на этом участке составляют 3,5-4,0 м. Благодаря террасированию угол наклона в 45° был уменьшен до 30°. Подпорные стенки, ступени и асфальтированные спуски на объекте спроектированы рационально и находятся в удовлетворительном состоянии. Большая часть склона, около 90 %, представлена открытыми пространствами. Предполагаемый изначально газон на склоне в настоящее время представляет собой пустырь. На самой верхней его части создана рядовая посадка из тополя черного ф. 'Пирамидальная' (*Populus nigra* f. 'Pyramidalis'), главной функцией, которой является защита объекта от негативного воздействия автомобильной дороги – пыли и шума, также она формирует границы участка. Со стороны ул. Троллейбусная имеется вход на территорию партерного сквера, который акцентирует группа из форзиции средней (*Forsythia x intermedia* Zabel.).

Учитывая природные и экологические условия, стоит отметить, что подбор ассортимента растений для данной территории ограничивается следующими факторами:

- склон в течение всего дня находится под открытым солнцем, а также подвержен воздействию ветра;
- участок претерпевает постоянное негативное влияние со стороны дороги;

- склон подвержен смыву грунта;
- в результате стихийного передвижения по нему большая часть территории вытоптана.

С учетом этих факторов нами предложено создать декоративные малые группы из кустарников:

Группа № 1 – спирея Вангутта (*Spiraea vanhouttei* (Briot) Zab.) – 1 экземпляр и можжевельник казацкий (*Juniperus sabina* L.) – 2 экземпляра. Эта смешанная, плотная пейзажная группа в период цветения спиреи будет наиболее контрастной. Спирея в данной группе будет выступать ядром. Можжевельник казацкий, расположенный симметрично по отношению к ней, являясь фоном, также будет подчеркивать округлую форму ее куста, и сохранять декоративность группы круглый год. Расстояние между кустами можжевельника в данной группе 2 м, их предлагаем расположить ниже спиреи, каждый на расстоянии 1,5 м от доминанты.

Группа № 2 – вдоль дороги-въезда на автомобильную площадку предлагаем высадить рядовую посадку кизильника горизонтального (*Cotoneaster horizontalis* Decne) – 6 экземпляров на расстоянии друг от друга 1,5 м, расстоянии от подпорной стенки 1 м. Данное однопородное линейное насаждение будет декоративным в любое время года благодаря блестящей вечнозеленой листве кизильника.

Группа № 3 – группа из можжевельника казацкого (*J. sabina* L.) – 3 экземпляра и хеномелеса японского (*Chaenomeles japonica* (Thunb.) Spach) – 3 экземпляра. Данная плотная группа кругового обзора, построенная на контрастах формы листьев и цвета, особенно в период цветения хеномелеса. Хеномелес будет являться доминантой. Растения предлагаем расположить симметрично. Хеномелес в центре группы, на расстоянии 1 м друг от друга, при этом растения образуют равносторонний треугольник. Можжевельник вокруг на расстоянии 1 м от растений хеномелеса и 2 м друг от друга, образуя равносторонний треугольник со сторонами 2 м.

Группа № 4 – форзиция средняя (*Forsythia intermedia* Zabel.) – 1 экземпляр, барбарис Тунберга ф ‘Темно-пурпурная низкая’ (*Berberis thunbergii f ‘Atropurpurea Nana’*) – 2 экземпляра, кизильник горизонтальный (*C. horizontalis* Decne) – 1 экземпляр. Эта ассиметричная по композиции группа кругового обзора будет декоративна круглый год. Яркие желтые краски форзиции, доминирующей весной в период цветения, летом сменят темно-пурпурная листва барбариса, а кизильник будет выступать окантовкой этой группы и смягчать жесткие линии подпорной стенки. Предлагаем высадить форзицию на расстоянии 3 м от нижней подпорной стенки, чуть правее (под углом 30° к оси, перпендикулярной к подпорной стенке) на расстоянии от форзиции 1,5 м один экземпляр барбариса, за ним второй. Левее и ниже (под углом 20° к оси, перпендикулярной к подпорной стенке), на расстоянии 2 м от форзиции, поместить куст кизильника.

Группа № 5 – в этой растительной группе предлагаем добавить к уже существующему экземпляру церциса европейского (*Cercis siliquastrum* L.) 3 куста магонии падуболистной (*Mahonia aquifolium* (Pursh) Nutt.). Магония – это вечнозеленое растение, способное поддерживать декоративность группы круглый год. Доминантой в данной малой группе будет являться церцис, по цвету – группа

будет нюансной, по форме листьев и размерам растений – контрастной, многоярусной, ассиметричной по композиции. Учитывая расположение на объекте церциса, можно сформировать угловую композицию. Кусты магонии рекомендуем высадить на расстоянии 3 м от церциса и 1-1,5 м друг от друга.

Группа № 6 – форзиция средняя (*Forsythia intermedia* Zabel.) – 2 экземпляра, барбарис Тунберга (*Berberis thunbergii* DC.) – 3 экземпляра и снежноягодник белый (*Symporicarpos albus* (L.) Blake) – 2 экземпляра. Эта контрастная, ассиметричная малая кустарниковая группа создана без применения хвойных растений, ее эстетический эффект зависит от разных периодов максимальной декоративности используемых кустарников. Форзиция наиболее декоративна с апреля, благодаря своим ярко-желтым многочисленным цветкам, которые распускаются до появления листвы. Именно она весной будет являться главным акцентом композиции. Барбарис, в первую очередь, декоративен благодаря своей яркой листве, продолжительное время сохраняющейся на ветвях, наиболее декоративен он осенью. Снежноягодник декоративен благодаря белым плодам, долгое время сохраняющимся на побегах.

Группы декоративных кустарников предлагаем дополнить следующими неприхотливыми многолетними цветочными растениями:

- в зоне чуть ниже кустарниковых групп, окаймляя их, предлагаем высадить герань крупнокорневищную (*Geranium macrorrhizum* L.) – возле групп № 3, 4, 5, и зверобой чашечковый (*Hypericum calycinum* L.) – возле групп № 1, 4, 6. Растения эти могут выносить полутень, но прекрасно себя чувствуют на солнце, не требовательны к влаге;

- между кустарниками группами предлагаем расположить на разной высоте группы из курильского чая кустарникового (*Pentaphylloides fruticosa* (L.) O. Schwarz.) и группы из очитка видного (*Sedum spectabile* L.) – курильский чай отличается ярким и продолжительным цветением в течение всего лета, а очиток видный необыкновенно украсит склон осенью;

- в зоне вдоль подпорной стенки логично высадить низкорослые почвопокровные растения, которые защитят грунт от смыва и приадут озеленению склона завершенность, это – флокс шиловидный (*Phlox subalata* L.), дриада восьмилепестная (*Dryas octopetala* L.) и камнеломка Арендса (*Saxifraga x arendsi* Rot.).

Подбор этих растений основан на таких основных признаках:

- они хорошо выносят прямые солнечные лучи;
- засухоустойчивы;
- хорошо укрепляют грунт на склоне;
- способны разрастаться, т.е. необходимо минимальное количество посадочного материала;
- сохраняют свою декоративность и после цветения (многие из них являются вечнозелеными).

Ассортимент и количество растений, необходимое для реконструкции террасированного склона на территории партерного сквера, приведены в ассортиментной ведомости (табл. 1).

Таблица 1

Ассортимент растений на террасированном склоне партерного сквера Дворца культуры профсоюзов в г. Симферополе

№	Название		Количество, шт.	
	русское	латинское	существующие	по проекту
деревья				
1	Тополь черный ф. 'Пирамидальная'	<i>Populus nigra f.</i> 'Pyramidalis'	15	-
2	Церцис европейский	<i>Cercis siliquastrum</i> L.	1	-
кустарники				
3	Форзиция средняя	<i>Forsythia x intermedia</i> Zabel.	3	3
4	Спирея Вангутта	<i>Spiraea vanhouttei</i> (Briot) Zab.	-	1
5	Кизильник горизонтальный	<i>Cotoneaster horizontalis</i> Decne	-	7
6	Барбарис Тунберга	<i>Berberis thunbergii</i> DC.	-	3
7	Барбарис Тунберга ф. 'Темно-пурпурная низкая'	<i>Berberis thunbergii f.</i> 'Atropurpurea Nana'	-	2
8	Снежноягодник белый	<i>Symporicarpos albus</i> (L.) Blake	-	2
9	Хеномелес японский	<i>Chaenomeles japonica</i> (Thunb.) Spach	-	3
10	Магония падуболистная	<i>Mahonia aquifolium</i> (Pursh) Nutt.	-	3
11	Можжевельник казацкий	<i>Juniperus sabina</i> L.	-	5
Всего:			19	29
многолетние цветочные растения (почвопокровные)				
12	Герань крупнокорневищная	<i>Geranium macrorrhizum</i> L.	-	15
13	Зверобой чашечковый	<i>Hypericum calycinum</i> L.	-	15
14	Курильский чай кустарниковый	<i>Pentaphylloides fruticosa</i> (L.) O. Schwarz.	-	10
15	Очиток видный	<i>Sedum spectabile</i> L.	-	12
16	Флокс шиловидный	<i>Phlox subalata</i> L.	-	30
17	Дриада восьмилепестная	<i>Dryas octopetala</i> L.	-	20
18	Камнеломка Арендса	<i>(Saxifraga x arendsii</i> Rot.)	-	20
Всего:			-	122

ВЫВОДЫ

1. В результате инвентаризации озелененной территории Дворца культуры профсоюзов мы установили, что территория зонирована и организована рационально, большинство деревьев и кустарников на объекте в хорошем состоянии. Соотношение хвойных пород к лиственным – 8 % к 92 %. В

- неудовлетворительном состоянии находятся цветники и газоны, которые требуют реконструкции.
2. Комплексный анализ террасированного склона Дворца культуры профсоюзов показал, что инженерные сооружения спроектированы рационально и находятся в удовлетворительном состоянии. Территория склона представлена открытыми пространствами, которые составляют более 90 %. Имеется линейная посадка тополя черного на границе с ул. Троллейбусной, остальная часть склона не озеленена. Озеленение склона требует реконструкции.
 3. Предложен для реконструкции склона ассортимент красивоцветущих и декоративнолиственных кустарников (всего с имеющимися на объекте растениями 11 видов и садовых форм) и 7 видов многолетних цветочных растений. Ассортимент соответствует климатическим условиям и рекомендациям ведущих специалистов.

Внедрение предложенных проектных решений по озеленению террасированного склона партерного сквера Дворца культуры профсоюзов обеспечит предотвращение водной и ветровой эрозии почвы, позволит улучшить санитарно-гигиеническое состояние территории и повысить декоративность объекта.

Список литературы

1. Теодоронский В.С. Объекты ландшафтной архитектуры / В.С.Теодоронский, И.О.Боговая – М : МГУЛ, 2006. – 330 с.
2. Інструкція з технічної інвентаризації зелених насаджень у містах та селищах міського типу України – ГКН 03.08.007. – 2007. – К : Мін. агр. політ., 2007. – 24 с.
3. Колесников А.И. Декоративная дендрология. – М. : Лесная промышленность, 1974. – 708 с.
4. Методические рекомендации по подбору деревьев и кустарников для озеленения степного и предгорного Крыма. – Ялта : ГНБС, 1980. – 27 с.
5. Определитель высших растений Украины / Доброчаева Д. Н., Котов М. И., Прокудин Ю. Н. и др. – К: Наукова думка, 1987. – 548 с.

Зільберварт І.Р. Проектні пропозиції щодо озеленення терасованого схилу на території партерного скверу Палацу культури профспілок у м. Сімферополь / І.Р. Зільберварт, О.В. Зільберварт, С.О. Песковець // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2012. – Т. 25 (64), № 3. – С. 45-51.

Дана характеристика просторової організації, приведені результати інвентаризації насаджень, розроблені рекомендації по озелененню терасованого схилу на території партерного скверу Палацу культури профспілок в Сімферополі.

Ключові слова: терасований схил, озеленення, інвентаризація зелених насаджень.

Zil'bervarg I.R. Landscaping project proposal on terraced slope in the parterre square Culture Palace of Trade Unions in Simferopol / I.R. Zil'bervarg, E.V. Zil'bervarg, Peskovets S.A. // Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No 3. – P. 45-51.

In article gave characteristic of spatial organization, presented the results of the inventory areas, and developed recommendations for planting terraced slope in the parterre Square Trade Unions Palace of Culture in Simferopol.

Keywords: terraced slope, landscaping, green space inventory.

Поступила в редакцию 24.09.2012 г.

УДК 612-44 + 612.741

**ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЫ
БЕЛЫХ КРЫС В ХОДЕ РАЗВИТИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО
ГИПЕРТИРЕОЗА**

Кметко И.Л., Соболев В.И.

*Донецкий национальный университет, Донецк, Украина
E-mail: v.sobolev@mail.ru*

В экспериментах *in situ* установлено, что в ходе развития экспериментального гипертиреоза латентный период генерации «М-ответа» переднеберцовой мышцы белых крыс претерпевает ряд независимых фаз: укорочения, нарастания и стабилизации. В начальной фазе формирования гипертиреоза латентный период генерации «М-ответа» укорачивался на 15,6% в сравнении с контролем, а при выраженной степени, наоборот – удлинялся на 93%.

Ключевые слова: латентный период возбуждения мышцы, гипертиреоз.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из важных проблем физиологии нервно-мышечной системы является проблема гормонального контроля ее функционального состояния. Важное место в этой проблеме принадлежит исследованию физиологических и патофизиологических эффектов гормонов щитовидной железы на различные стороны регуляции базовых параметров сокращения скелетной мышцы [1–4]. К настоящему времени активно исследуется роль тиреоидных гормонов как естественных физиологических регуляторов энергетики сокращающейся скелетной мышцы [3, 5, 6]. В ряде работ [7, 8] установлено, что при экспериментальном гипертиреозе и тиреотоксикозе наступают существенные изменения в теплотворной функции скелетной мышцы, приводятся доказательства участия тиреоидных гормонов в регуляции эрготропных параметров мышечного сокращения – силы, мощности, работоспособности мышцы и т.п. Выявлен характер влияния различных моделей экспериментального гипертиреоза на энергетику мышечного сокращения [3, 5, 7]. Однако ряд аспектов указанной проблемы остаются недостаточно изученными, в частности представляет научно-теоретический и практический интерес вопрос о состоянии одного из базовых показателей сократительного акта – возбудимости скелетной мышцы при нарушении тиреоидного статуса.

Целью работы явилось измерение в условиях *in situ* латентного периода генерации «М-ответа» передней большеберцовой мышцы белых крыс в ходе нарастания степени выраженности экспериментального гипертиреоза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены на 70-ти взрослых белых крысах-самцах массой 285 ± 2 г. Все животные были разделены на 7 групп (табл.1). У животных первых 6-ти групп вызывался экспериментальный гипертриеоз разной степени выраженности путем ежедневных подкожных инъекций водного раствора гормона щитовидной железы трийодтиронина в дозе 15 мкг/кг. Седьмая группа служила контролем.

Показателями развития степени выраженности экспериментального гипертриеоза служили общепринятые симптомы – температура тела, скорость потребления кислорода, частота сердечных сокращений и масса тела. Показателем температуры тела служила ректальная температура, измеряемая с помощью электронного термометра с точностью $\pm 0,05$ °С. Скорость потребления кислорода определялась с помощью электронного газоанализатора «Radiometer», а частота сердечных сокращений – путем подсчета количества R-зубцов электрокардиограммы с помощью электронного кардиотахометра.

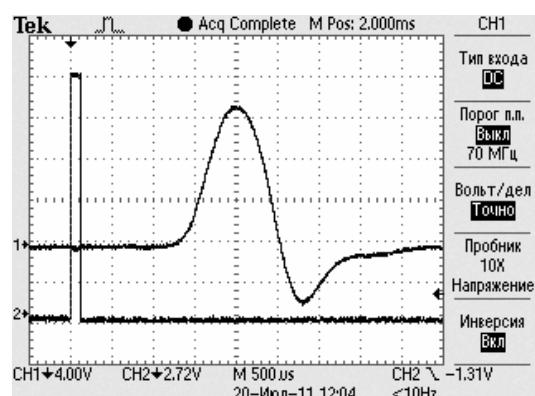


Рис.1 Образец записи «М-ответа» мышцы у крысы контрольной группы

Примечание: приведена копия снимка-оригинала с экрана осциллографа TDS2004C; на снимке изображена кривая «М-ответа» и электрический импульс электростимулятора.

генератора ICL8038. Амплитуда прямоугольных электрических импульсов стимулятора была равна 300 мВ при длительности импульса 100 мкс и частоте 4 имп/сц. Указанный нерв иннервирует переднюю большеберцовую мышцу. Затем в мышцу вводились два металлических игольчатых электрода с межэлектродным расстоянием 2 мм, соединенных с биоусилителем. Это позволило регистрировать вызванный электромиографический ответ («М-ответ») в виде суммарного биоэлектрического потенциала мышцы при раздражении нерва и измерить в последующем латентный период его генерации. Для усиления биопотенциалов мышцы применялся дифференциальный усилитель с режекторным гираторным фильтром (50 Гц), соединенный с цифровым драйвером (запоминающий цифровой осциллограф TDS2004C фирмы Tektronixs) и компьютером.

После подготовительного периода у животных всех групп в эксперименте *in situ* измеряли латентный период генерации «М-ответа» переднеберцовой мышцы при одиночных раздражениях импульсами стимулятора (рис.1). Ход опыта был следующим. Животное наркотизировалось (тиопентал натрия, в/б в дозе 75 мг/кг), после чего размещалось в станке экспериментальной установки. После измерения ректальной температуры, скорости потребления кислорода и частоты сердечных сокращений препаратировался малоберцовый нерв, который в последующем раздражался импульсами электростимулятора, построенного на базе функционального

После окончания опыта животные усыплялись в эксикаторе эфиро-хлороформенным наркозом.

Полученные данные обрабатывались с помощью общепринятых стандартных методов вариационной статистики с использованием пакетов анализа Excel и Statistica, 7.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ состояния физиологических показателей у животных экспериментальных групп показал (табл. 1), что инъекции трийодтиронина вызывали формирование типичных симптомов гипертиреоидного состояния. Так, к окончанию периода инъекций гормона (12-я инъекция) ректальная температура увеличилась до $39,3 \pm 0,2$ $^{\circ}\text{C}$ ($+1,6 \pm 0,22$ $^{\circ}\text{C}$), а скорость потребления кислорода и частота сердечных сокращений возросли соответственно на 58% и 99 ± 11 уд/мин. Масса тела несколько уменьшилась и составила 256 ± 6 г против 282 ± 2 г у контрольной группы животных.

Таблица 1
Характеристика некоторых физиологических показателей у животных опытных и контрольной групп

Группа	Число инъекций трийодтиронина	Физиологический показатель		
		Ректальная температура, $^{\circ}\text{C}$	Скорость потребления кислорода, мл/кг мин	Частота сердечных сокращений, уд/мин
2T3-группа n=10	2	$37,9 \pm 0,1$ $+0,2 \pm 0,14$, $p > 0,05$	$20 \pm 0,31$ $+5\%$, $p > 0,05$	387 ± 5 $+9 \pm 6$, $p > 0,05$
4T3-группа n=10	4	$38,1 \pm 0,1$ $+0,4 \pm 0,14$, $p < 0,05$	$23 \pm 0,43$ $+21\%$, $p < 0,05$	396 ± 6 $+18 \pm 7$, $p < 0,05$
6T3-группа n=10	6	$38,4 \pm 0,1$ $+0,7 \pm 0,14$, $p < 0,05$	$27 \pm 0,38$ $+42\%$, $p < 0,05$	415 ± 6 $+37 \pm 7$, $p < 0,05$
8T3-группа n=10	8	$38,8 \pm 0,1$ $+1,1 \pm 0,14$, $p < 0,05$	$28 \pm 0,45$ $+47\%$, $p < 0,05$	439 ± 7 $+61 \pm 8$, $p < 0,05$
10T3-группа n=10	10	$38,9 \pm 0,1$ $+1,2 \pm 0,14$, $p < 0,05$	$29 \pm 0,52$ $+52\%$, $p < 0,05$	462 ± 8 $+84 \pm 9$, $p < 0,05$
12T3-группа n=10	12	$39,3 \pm 0,2$ $+1,6 \pm 0,22$, $p < 0,05$	$30 \pm 0,64$ $+58\%$, $p < 0,05$	477 ± 7 $+99 \pm 11$, $p < 0,05$
К-группа (контроль) n=10	-	$37,7 \pm 0,1$	$19 \pm 0,23$	378 ± 4

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЫ...

Таким образом, можно сделать заключение о том, что эксперименты были выполнены на животных с разной степенью развития экспериментального гипертиреоза – от начальной степени до выраженной.

В ходе развития экспериментального гипертиреоза наступали выраженные изменения со стороны показателя, характеризующего возбудимость скелетной мышцы – латентного периода генерации «М-ответа» (табл. 2). Так, у животных с эутиреоидным статусом (контрольная группа) значение латентного периода составило $1,83 \pm 0,04$ мс. После 2-х кратной инъекции трийодтиронина латентный период генерации «М-ответа» укоротился на $0,18 \pm 0,058$ мс и достиг значения $1,74 \pm 0,05$ мс, что было на 9,3% короче, чем в контроле. В дальнейшем вместе с увеличением числа инъекций трийодтиронина латентный период достигал минимальной из зарегистрированных величин (4T3-группа), а затем начинал прогрессивно удлиняться. При выраженной степени экспериментального гипертиреоза, когда ректальная температура повышалась до $39,3 \pm 0,2$ 0С (12T3-группа), латентный период возбуждения мышцы удлинялся по сравнению с контролем на 93% и составлял $3,71 \pm 0,08$ мс.

Таблица 2
Динамика латентного периода генерации «М-ответа» переднеберцовой мышцы белых крыс в ходе формирования экспериментального гипертиреоза

Группа	Число инъекций трийодтиронина	Физиологический показатель	
		Ректальная температура, 0С	Латентный период генерации «М-ответа», мс
2T3-группа n=10	2	$37,9 \pm 0,1$	$1,74 \pm 0,05$ $-0,18 \pm 0,058$, p<0,05
4T3-группа n=10	4	$38,1 \pm 0,1$	$1,62 \pm 0,05$ $-0,30 \pm 0,058$, p<0,01
6T3-группа n=10	6	$38,4 \pm 0,1$	$1,98 \pm 0,06$ $+0,06 \pm 0,067$, p>0,05
8T3-группа n=10	8	$38,8 \pm 0,1$	$2,35 \pm 0,07$ $+0,43 \pm 0,076$, p<0,01
10T3-группа n=10	10	$38,9 \pm 0,1$	$3,60 \pm 0,07$ $+1,68 \pm 0,076$, p<0,01
12T3-группа n=10	12	$39,3 \pm 0,2$	$3,71 \pm 0,08$ $+1,79 \pm 0,085$, P<0,01
К-группа (контроль) n=10	-	$37,7 \pm 0,1$	$1,92 \pm 0,03$

Характер зависимости латентного периода возбуждения переднеберцовой мышцы от числа инъекций трийодтиронина (рис. 2) описывается полиномиальным уравнением при высокой степени достоверности аппроксимации кривой ($R^2=0,989$, $p=0,0347$). Из рисунка видно, что зависимость имела S-образный вид с выраженным

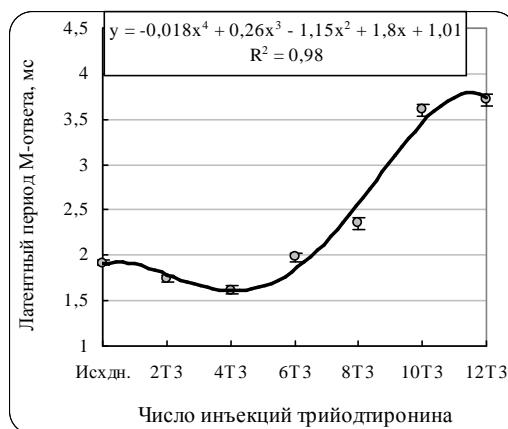


Рис.2. Характер зависимости латентного периода генерации «M-ответа» от количества инъекций трийодтиронина

Примечание: каждая точка на кривой представляет среднюю величину из 10 вариантов

латентным периодом генерации «M-ответа» и величиной ректальной температуры. Собственно зависимость представлена на рис.3. Как и в предыдущем случае, зависимость описывалась полиномиальным уравнением и визуально имела разнородные участки (секторы).

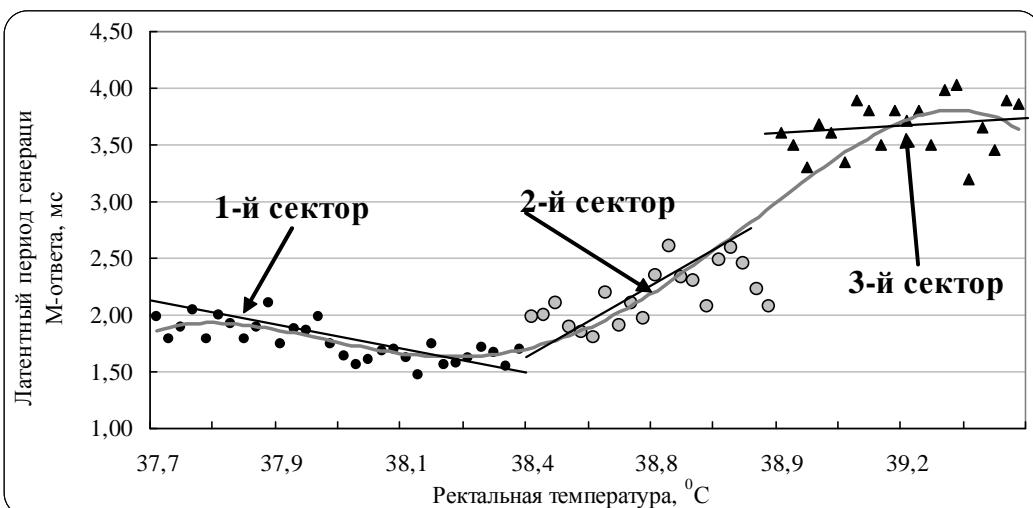


Рис.3. Зависимость латентного периода генерации «M-ответа» от величины ректальной температуры у белых крыс в ходе развития экспериментального гипертиреоза (n=70)

фазами. Поскольку число инъекций в конечном итоге определяет степень выраженности экспериментального гипертиреоза, то можно полагать, что возбудимость скелетной мышцы на разных этапах формирования состояния гипертиреоза претерпевает определенные стадии, качественно отличающихся друг от друга.

Аналогичная по характеру зависимость имела место и при построении зависимости латентного периода от величины ректальной температуры, которая непосредственно отражает степень выраженности экспериментального гипертиреоза (рис.3). С этой целью первоначально была построена зависимость между

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЫ...

Достаточно большая длина вариационного ряда позволила с целью выяснения возможности существования отдельных множеств в целостной совокупности использовать кластерный и дисперсионный анализы.

В табл.3 представлены результаты кластерного анализа целостной совокупности с применением метода k-средних. Видно, что целостная совокупность хорошо подразделяется на 3 кластера, что свидетельствует о реальности существования в исследуемом вариационном ряду, по крайне мере, трех множеств, располагающихся в разных участках шкалы «Х» (шкалы ректальной температуры).

Таблица 3
К анализу характера зависимости латентного периода генерации «М-ответа» переднеберцовой мышцей белых крыс от величины ректальной температуры в ходе формирования экспериментального гипертриеоза (кластерный анализ)

Физиологический показатель	Ректальная температура, $^{\circ}\text{C}$		
	КЛАСТЕРЫ		
	I-й n=30	II-й n=20	III-й n=20
	$37,9 \pm 0,11 \ ^{\circ}\text{C}$	$38,6 \pm 0,13 \ ^{\circ}\text{C}$	$39,1 \pm 0,15 \ ^{\circ}\text{C}$
Латентный период генерации «М-ответа», мс	$1,76 \pm 0,027$	$2,16 \pm 0,06$	$3,65 \pm 0,05$
Различия по отношению к данным в 1-ом кластере	-	$+0,4 \pm 0,065$ $p < 0,05$	$+1,89 \pm 0,057$ $p < 0,05$

Обращает на себя внимание тот факт, что в каждом из выделенных множеств характер зависимости латентного периода от ректальной температуры описывается уравнениями прямой линии с разными коэффициентами регрессии (табл.4),, отличающихся не только по своей абсолютной величине, но и по знаку. Так, в начале шкалы температуры латентный период вместе с ростом степени выраженности гипертриеоза укорачивался, что свидетельствует о повышении возбудимости мышечных волокон в начальной стадии развития экспериментального гипертриеоза. В дальнейшем вместе с ростом степени гипертермии, которая отражает выраженность гипертриеоза, латентный период генерации «М-ответа» начинал удлиняться, о чем свидетельствует знак и величина коэффициента регрессии в уравнении ($+0,95 \pm 0,17 \text{ мс/}^{\circ}\text{t}$). Наконец, при выраженному гипертриеозе, характеризующимся гипертермией $38,9 - 39,4 \ ^{\circ}\text{C}$, латентный период возбуждения мышцы, во-первых, существенно удлинялся, и во-вторых, уже не зависел от величины ректальной температуры. Об этом, в частности, свидетельствует

статистически недостоверный коэффициент регрессии в уравнении зависимости (табл.4, рис.3).

Подтверждением существования независимых отдельных множеств в целостном вариационном ряду является результат использования двухвыборочного F-теста для дисперсий. Так, сравнение дисперсий в 1-ом и 2-ом множествах (начало и середина диапазона значений ректальной температуры, рис.3, табл.4) показало, что указанные множества принадлежат к разным совокупностям ($p=0,0284$). Множество, расположенное в конце шкалы температуры ($38,9 - 39,4 {}^{\circ}\text{C}$) также статистически достоверно отличалось от предшествующего ($p=0,0472$).

Таким образом, в ходе развития экспериментального гипертиреоза возбудимость скелетной мышцы вначале нарастает, а затем ухудшается, оставаясь при высокой степени выраженности экспериментального гипертиреоза на существенно низком уровне.

Таблица 4
К анализу характера зависимости между латентным периодом (ЛП, мс)
генерации «М-ответа» и температурой тела (t^0) у животных в разных участках
шкалы значений ректальной температуры

Показатель	Диапазоны ректальной температуры, ${}^{\circ}\text{C}$		
	37,7 – 38,4	38,4 – 38,9	38,9 – 39,4
Уравнение регрессии	$\text{ЛП} = -0,75t^0 + 39,2$	$\text{ЛП} = 0,95t^0 - 33,5$	$\text{ЛП} = 0,21t^0 - 6,9$
Коэффициент регрессии, $\text{мс}/{}^{\circ}\text{t}$	$-0,75 \pm 0,12$ $p=1,8 \text{ E-}06$	$+0,95 \pm 0,17$ $p=6,2 \text{ E-}05$	$+0,21 \pm 1,02$ $p=0,32$
Постоянный член	$39,2 \pm 0,92$ $p=2,8 \text{ E-}05$	$-33,5 \pm 6,8$ $p=0,00023$	$-6,9 \pm 10,3$ $p=0,51$
Коэффициент корреляции	$0,75 \pm 0,08$ $p<0,05$	$0,78 \pm 0,09$ $p<0,05$	$0,23 \pm 0,21$ $p>0,05$
Количество вариантов (животных)	30	20	20

Данный результат указывает на разнотипные механизмы действия трийодтиронина на фундаментальные характеристики сократительного акта, которые последовательно инициируются и ингибируются в ходе развития выраженного экспериментального гипертиреоза. С нашей точки зрения, механизмы подобного действия трийодтиронина, по-видимому, связаны со способностью тиреоидного гормона изменять электрофизиологические характеристики нервно-мышечного аппарата, в частности модулировать процесс синаптической передачи возбуждения с нерва на мышцу [4, 6]. В результате подобного эффекта трийодтиронина возможны перестройки всех звеньев нервно-мышечной системы, в том числе и нервно-мышечного синапса. В литературе существуют сообщения в пользу позитивного влияния гипертиреоидных состояний на плотность Na^+ -каналов

в плазматической мемbrane [9–11] и продолжительность нахождения их в открытом состоянии в момент деполяризации мембраны мышечного волокна, а также на активность и концентрацию молекул Ca^{2+} -АТФазы в мембранах саркоплазматического ретикулума, сродство контрактильного аппарата мышечного волокна к ионам Ca^{2+} , синтез миофибрillлярных белков, активность АТФазы миозина, определяющей тип мышечного волокна и его скоростные характеристики [12–14]. Таким образом, гипертиреоз вызывает многочисленные изменения со стороны различных звеньев нервно-мышечного аппарата, что является проявлением их патофизиологического эффекта, выраженность которого определяется степенью нарушения тиреоидного статуса.

ВЫВОДЫ

1. В экспериментах *in situ* установлено, что в ходе развития экспериментального гипертиреоза латентный период генерации «М-ответа» переднеберцовой мышцей белых крыс претерпевает ряд независимых фаз: укорочения, нарастания и стабилизации.
2. В начальной фазе формирования экспериментального гипертиреоза латентный период генерации «М-ответа» укорачивается на 15,6% в сравнении с контролем, а при выраженной степени, наоборот – удлиняется на 93%.

Перспективы дальнейших исследований связаны с последующим изучением природы выявленного феномена укорочения латентного периода возбуждения мышечных волокон в начальной стадии развития экспериментального гипертиреоза. В частности, в дальнейших исследованиях предполагается выяснение характера влияния измененного тиреоидного статуса на другие звенья сократительного акта в условиях нарастающего экспериментального гипер- и тиреотоксикоза.

Список литературы

1. Неруш П.О. Вікові особливості функціонування нервово-м'язової системи щурів за умов гіпертиреозу / П.О. Неруш, Є.А. Макій, О.Г. Родинський // Фізіол. журн. – 2001. – Т.47, №5. – С. 12-17.
2. Соболев В.І. Вплив експериментального атиреозу на енергетику ізометричного скорочення м'яза білого щура (дослідження *in situ*) / В.І. Соболев, Т.В. Москалець // Фізіол. журн. – 2007. – Т.53. – №5. – С.86-90.
3. Труш В.В. Изменение силовых характеристик скелетной мышцы белых крыс в процессе углубления экспериментального гипертиреоза / В.В. Труш, В.И. Соболев // Архив клин. и эксперим. медицины. – 2003. – Т.12, №2. – С.144-150
4. Wolege R.C., Curtin N.A., Hompsher E. Energetic aspect of muscle contraction. New York; London,1983. – 290 р.
5. Попова В.В. Влияние экспериментального гипертиреоза на величину работы мышцы и особенности развития утомления / В.В.Попова, В.И. Соболев // Вісник проблем біології і медицини.-2002. - Вип.4. – С.16-21.
6. Родинський О.Г. Дія прозерину на викликані відповіді скелетного м'яза за умов експериментального гіпертиреозу / О.Г. Родинський // Тези доповідей II національного з'їзду фармакологів України. – Дніпропетровськ. – 2001. – С. 207-208.
7. Соболев В.И. Фазы мышечного сокращения при экспериментальном гипертиреозе / В.И. Соболев, Н.Т. Лапенко // Физиологический журнал СССР им. И.М. Сеченова. – 1986. – № 3. – С. 381-384.

8. Соболев В.И. Влияние экспериментального гипертиреоза на тепловой эффект мышечного сокращения / В.И. Соболев, М.С. Махсудов, Маурисио Дакошта, Рабо Гемедо // Архив клинической и экспериментальной медицины. – 1993. – № 1. – С. 29-31.
9. Brodie C. Characterization of thyroid hormone effects on Na-K pump and membrane potential of cultured rat skeletal myotubes / C. Brodie, S.R. Sampson // Endocrinology. – 1988. – № 2. – P. 891-897.
10. Clausen T. Regulation of the Na-K pump in skeletal muscle / T. Clausen, M.E. Everts // Kidney Int. – 1989. – №1. – P. 1-13.
11. Harris D.R. Acute thyroid hormone promotes slow inactivation of sodium current in neonatal cardiac myocytes / D.R. Harris, W.L. Green, W. Craelius // Biochem. Biophys. Acta. – 1991. – Vol. 1095, № 2. – P. 175-181.
12. Connelly T.J. L-thyroxine activates the intracellular Ca²⁺ release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum / T.J. Connelly, R. Hayek, S.M. Ukhareva et al. // Biochem. Mol. Biol. Int. – 1994. – V. 32, № 3. – P. 441-448.
13. Davis P.J. Thyroid hormone regulation of membrane Ca²⁺-ATPase activity / P.J. Davis, F.B. Davis, W.D. Lawrence // Endocr. Res. – 1989. – V. 15. – P. 651-682.
14. Warnick P.R. Rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase activity: stimulation in vitro by thyroid hormone analogues and bipyridines / P.R. Warnick, P.J. Davis, F.B. Davis et al. // Biochem. Biophys. Acta. – 1993. – V. 1153. – P. 184-190.

Кметко И.Л. Функціональний стан скелетного м'яза білих щурів в ході розвитку експериментального гіпертиреозу / І.Л. Кметко, В.І. Соболев // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2012. – Т. 25 (64), № 3. – С. 52-60.

В експериментах *in situ* встановлено, що в ході розвитку експериментального гіпертиреозу латентний період генерації «М-відповіді» великомілковим м'язом білих щурів зазнає ряд незалежних фаз: укорочення, нарощання і стабілізації. В початковій фазі формування гіпертиреозу латентний період генерації «М-відповіді» коротшив на 15,6% порівняно з контролем, а при виразному ступені, навпаки – подовжувався на 93%.

Ключові слова: латентний період збудження м'яза, гіпертиреоз.

Kmetko I.L. The functional condition of the skeletal muscle of white rats in dynamics of the development of experimental hyperthyreosis / Kmetko I.L., Sobolev V.I. // Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No 3. – P. 52-60.

In experiments *in situ* it has been established, that the latent period of the generation of "M-answer" of a forward tibial muscle of white rats has been undergone a number of independent phases in a process of the development of experimental hyperthyreosis: shortenings, increase and stabilization. The latent period of the generation of "M-answer" had been shortened for 15,6% in comparison with control in an initial phase of the formation of hyperthyreosis, and, on the contrary, had been extended for 93% at the expressed degree of hyperthyreosis.

Keywords: latent period of muscular excitement, hyperthyreosis.

Поступила в редакцию 12.09.2012 г.

УДК: 616-001.4-089-032:611-013.395

ВИВЧЕННЯ БАЛАНСУ ТІАМІНУ В М'ЯЗАХ ДОНОРА ПІСЛЯ АЛОТРАНСПЛАНТАЦІЇ ЕМБРІОНАЛЬНОЇ ТКАНИНИ

Кобильник С.М., Разумнова А.Ю., Петров С.А.

*Одесський національний університет ім. І.І. Мечникова, Одеса, Україна
E-mail: kobylnik71@mail.ru*

Одним із актуальних напрямків в сучасній теоретичній та медичній біохімії являється вивчення біохімічних процесів при трансплантації ембріональних тканин для стимуляції та відновлення функцій організму. Метою нашої роботи було вивчення розподілу вітаміну В1 при алотрансплантації в сформованих і ембріональних м'язових тканинах. Трансплантація черевної ембріональної тканини призводить до збільшення рівня вільного тіаміну в тканині акцептора за рахунок зниження цього показника в тканині ембріона. Трансплантація ембріональних тканин призводить до зменшення рівня вільного тіаміну в черевному м'язі акцептора. Трансплантація тканин щурів з одного послиду призводить до зменшення рівня вільного тіаміну у всіх досліджуваних тканинах.

Ключові слова: алотрансплантація, трансплантат, тіамін, м'язова тканина.

ВСТУП

Одним із актуальних напрямків в сучасній теоретичній та медичній біохімії являється вивчення біохімічних процесів при трансплантації ембріональних тканин для стимуляції та відновлення функцій організму [1].

В рамках даного наукового напрямку одне з провідних місць належить трансплантації ембріональної тканини, яку розглядають як можливу альтернативу традиційним консервативним методам лікування, а також як методологічну основу експериментальних розробок [2].

Ця обставина підкреслює актуальність проблеми в експериментальній та клінічній біохімії та перспективність застосування пересадки ембріональних тканин [3, 4].

З числа важливих питань, що мають медико-біологічне значення ключовим являються питання функціонування та збільшення життєздатності трансплантата. В цьому відношенні відомо, що після трансплантації ембріональної тканини, трансплантат зростає та диференціюється [5], проростає кровоносними судинами [6], утворюючи тим самим умови для оксигенації та енергетичного забезпечення своєї діяльності.

Згідно з сучасними уявленнями вітаміни та їх похідні функціонують в організмі як коензими, клітинні антиоксиданти, а також як регулятори генної експресії [7]. Вітамін В1 необхідний для окисного декарбоксилювання кетокислот, синтезу ацетилхоліну, він бере участь у вуглеводному обміні й пов'язаних з ним

енергетичному, жировому, білковому обміні, надає регулюючу дію на трофіку й діяльність різних систем [8].

Відомості про особливості розподілу тіаміну в динаміці між тканиною донора і акцептора при трансплантації ембріональної тканини не знайшли належного відображення в літературі.

Метою нашої роботи було вивчення розподілу вітаміну В1 при алотрансплантації в сформованих і ембріональних м'язових тканинах.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Експеримент проводився на кафедрі біохімії ОНУ ім. І.І. Мечникова. Дослідження проводили на 108 білих статевозрілих щурах, масою 180-280 гр. В роботі були дотримані вимоги Європейської конвенції про захист тварин, які використовуються в експериментальних цілях.

Операцію проводили в умовах асептики. Операційне поле обробляли 1% розчином йодопірона. Джерелом ембріональних тканин служили ембріони вагітних самок з терміном вагітності 3.5-4 тижнів. У ембріонів вилучають черевну м'язову тканину і проводили підсадку до дорослої гомологічної тканини дорослого щура. Аналогічна процедура проводилась з стегновою м'язовою тканиною. Трансплантацію у щурів з одного послиду служила тканина дорослої особини. Також щурам проводилася операція без підсадки. Раньову поверхню зшивали простим хірургічним швом [9]. Накладалася стерильна пов'язка. Евтаназію проводили шляхом пропускання електричного струму через довгастий мозок.

Для визначення вільного тіаміну використовували метод окислення тіаміну в тіохром, екстракції останнього в органічний розчинник і вимірюванні інтенсивності флуоресценції [10].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

При алотрансплантації ембріональної стегнової м'язової тканини (таблиця 1) кількість вільного тіаміну в м'язі акцептора на 1 і 3 добу експерименту достовірно зменшилася відносно контрольного значення. У стегновій м'язовій тканині ембріона досліджуваний показник на 1-у добу експерименту перевищував у 9 разів контрольне значення. На 3 і 7 добу дослідження рівень вільного тіаміну знижувався, але залишався вище контрольного показника в 5-6 разів.

У черевній м'язовій тканині акцептора досліджуваний показник протягом доби поступово збільшувався і залишався більше контрольного значення.

У ембріональній черевній м'язовій тканині спостерігалось достовірне зменшення вільного тіаміну відносно контролю на першу та сьому добу експерименту.

Порівнюючи вміст вільного тіаміну в стегновій м'язовій тканині акцептора і ембріона можна відзначити, що рівень вільного тіаміну в стегновій м'язовій тканині ембріона достовірно менше, ніж в стегновому м'язі самця. Однак, після алотрансплантації на 1, 3 і 7 добу досліджуваний показник в м'язі ембріона істотно перевищував рівень вільного тіаміну в стегновому м'язі самця. Порівнюючи вміст вільного тіаміну в м'язовій тканині акцептора і ембріона можна відзначити, що в

ембріональної тканині він був істотно вище, ніж у тканині акцептора. Після алотрансплантації черевної м'язової тканини в м'язі акцептора вміст вітаміну В1 на протязі доби поступово збільшувався, а в підсадженій ембріональній тканині він різко падав до сьомої доби експерименту.

Таблиця 1
Рівень вільного тіаміну при трансплантації ембріональної м'язової тканини
(мкг/г тканини)

Доба	Стегновий м'яз акцептора	Стегновий м'яз ембріона	Черевний м'яз акцептора	Черевний м'яз ембріона
Контроль	9.1 ± 0.1	3.1 ± 0.9 **	2.8 ± 0.4	18.9 ± 4.9 **
I	$4.1 \pm 0.8^*$	$29.3 \pm 6.7^*$ **	$5.3 \pm 1.0^*$	12.5 ± 4.5
III	$3.8 \pm 0.9^*$	$15.2 \pm 4.4^*$ **	$10.1 \pm 2.8^*$	20.5 ± 6.3
VII	7.0 ± 2.8	$18.2 \pm 2.8^*$ **	30.02 ± 14.4	$3.0 \pm 0.5^*$

Примечание:

P_1^* – достовірно по відношенню до контролю

P_2^{**} – достовірно між м'язовою тканиною донора та акцептора.

Для того щоб з'ясувати, чи є спостережувані нами ефекти результатом впливу ембріональної тканини на сформовану тканину або вони є наслідком трансплантації або оперативного втручання, ми провели дві серії досліджень, в яких була проведена трансплантація гомологічних тканин від щурів з одного посліду і дослідження з тваринами оперованими без підсадки.

При алотрансплантації стегнової м'язової тканини, взятої у тварин з одного посліду (таблиця 2) на 1 і 7 добу експерименту спостерігалося достовірне зменшення рівня вільного тіаміну в стегновому м'язі донора і акцептора щодо контролю. У черевній м'язової тканини донора акцептора на першу добу експерименту рівень вільного тіаміну достовірно збільшувався щодо контрольних показників. На сьому добу після алотрансплантації в черевній м'язовій тканині акцептора досліджуваний показник достовірно зменшувався по відношенню до контролю. Порівнюючи досліджувані м'язові тканини між собою можна відзначити, що достовірне зменшення досліджуваного показника спостерігалося в стегновому м'язі акцептора на 1-у добу експерименту. В інших випадках достовірних змін не було.

Таблиця 2

Рівень вільного тіаміну при трансплантації тканини щурів з одного посліду(мкг/г тканини)

Доба	Стегновий м'яз акцептора	Стегновий м'яз ембріона	Черевний м'яз акцептора	Черевний м'яз ембріона
Контроль	9.1 ± 0.1	9.1 ± 0.1	2.8 ± 0.4	2.8 ± 0.4
I	6.4 ± 0.1* **	7.4 ± 0.3*	6.8 ± 0.2*	8.2 ± 0.6*
III	12.3 ± 5.1	17.0 ± 6.0	11.4 ± 3.9	23.7 ± 3.9*
VII	3.5 ± 1.3*	1.8 ± 0.2*	1.8 ± 0.2*	1.5 ± 3.9

Примечание:

P₁* – достовірно по відношенню до контролю

P₂** – достовірно між м'язовою тканиною донора та акцептора

Проаналізувавши вище вказані результати ми вирішили визначити, чи впливає оперативне втручання на рівень вільного тіаміну.

При операції без підсадки (таблиця 3) в стегновому м'язі самця на 3 і 7 добу експерименту спостерігалося достовірне зменшення рівня вільного тіаміну відносно контролю. У черевній м'язовій тканині самця збільшення досліджуваного показника відносно контролю спостерігалося на 1-у добу експерименту. У решті досліджуваних термінів достовірних змін не було.

Таблиця 3

Рівень вільного тіаміну при операції без підсадки (мкг/г тканини)

Доба	Стегновий м'яз самця	Черевний м'яз самця
Контроль	9.1 ± 0.1	2.8 ± 0.4
I	6.3 ± 1.7	8.0 ± 1.6*
III	4.7 ± 1.6*	6.0 ± 2.8
VII	5.0 ± 1.7*	4.9 ± 1.2

Примечание:

P₁* – достовірно по відношенню до контролю.

ВИСНОВКИ

1. Трансплантація черевної ембріональної тканини призводить до збільшення рівня вільного тіаміну в тканині акцептора за рахунок зниження цього показника в тканині ембріона.
2. Трансплантація ембріональних тканин призводить до зменшення рівня вільного тіаміну в черевному м'язі акцептора.
3. Трансплантація тканин щурів з одного посліду призводить до зменшення рівня вільного тіаміну у всіх досліджуваних тканинах.

Список літератури

1. Костный мозг как источник получения мезенхимальных клеток для восстановительной терапии поврежденных органов / В.И. Шумаков, Н.А. Онищенко, Н.Е. Крашенинников [и др.] // Вест, трансплант. и искусств. орг. – 2002 а. – №4. – С. 3–6.
2. Нейротрансплантация в лечение травмы спинного мозга. / Д.С. Станков, П.И. Катунян, Н.Е. Крашенинников [и др.] // Вест, трансплант. и искусств. органов. – 2003. – №1. – С. 44–52.
3. Bjorklund A. Cholinergic reinnervation of the rat hippocampus by septal implants is stimulated by perforant path lesion / A. Bjorklund, L.F. Kromer, V. Stenevi // Brain Kes. – 1998. – Vol. 173. – P. 57–64.
4. Александрова Н.А. Трансплантация культивированных нейральных стволовых клеток плода человека в мозг крыс, подвергающихся острой гипоксии. / Н.А. Александрова, О.В. Подгорный [и др.] // Бюл. эксперим. биол. и медицины. – 2004. – Т. 137, №5. – С. 296–300.
5. Gaillard A. Early commitment of embryonal neocortical cells to develop area-specific thalamic connections / Gaillard A. // Roder. Cereb. Cortex. – 2000. – Vol. 10. – P. 443–453
6. Лосева Е.В. Нейротрансплантация фетальных тканей и компенсаторно-восстановительные процессы ЦНС / Е.В. Лосева // Успехи физиол. наук. – 2001. – Т. 32, №1. – С. 19–37.
7. Островский Ю.М. Тиамин / Ю.М. Островский. – Минск, 1971. – 144 с.
8. Березов Т.Т. Биологическая химия / Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин. – М. Медицина, 1998. – 220 с.
9. Слепцов Н.В. Узлы в хирургии / Н.В. Слепцов, Р.А. Черников. – СПб.: Салит-Медкнига, 2000. – 176 с.
10. Елисеева Г.Д. Витамины // Г.Д. Елисеева. – Киев, 1953. – С. 38.

Кобыльник С.Н. Изучение баланса тиамина в мышцах донора после аллотрансплантации эмбриональной ткани / С.Н. Кобыльник, А.Ю. Разумнова, С.А. Петров // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2012. – Т. 25 (64), № 3. – С.61-65.

Одним из актуальных направлений в современной теоретической и медицинской биохимии является изучение биохимических процессов при трансплантации эмбриональных тканей для стимуляции и восстановления функций организма. Целью нашей работы было изучение распределения витамина В1 при аллотрансплантации в сформированных и эмбриональных мышечных тканях. Трансплантация брюшной эмбриональной ткани приводит к увеличению уровня свободного тиамина в ткани акцептора за счет снижения этого показателя в ткани эмбриона. Трансплантация эмбриональных тканей приводит к уменьшению уровня свободного тиамина в брюшной мышце акцептора. Трансплантация тканей крыс одного помета приводит к уменьшению уровня свободного тиамина во всех исследуемых тканях.

Ключевые слова: аллотрансплантация, трансплантат, тиамин, мышечная ткань.

Kobylnik S.N. The study of the balance of thiamine in the muscle after allotransplantation of a donor fetal tissue / S.N. Kobylnik, A.Y. Razumnova, S.A. Petrov // Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No. 3. – P. 61-65.

One of the important trends in modern theoretical and Medical Biochemistry is the study of biochemical processes in the transplantation of fetal tissue to stimulate and restore functions. The aim of our study was to investigate the distribution of thiamine in allotransplantation formed in the embryo-tional and muscle tissue. Transplantation of the abdominal fetal tissue leads to increased levels of free thiamine in the tissues of the acceptor due to reduction in the tissues of the embryo. Transplantation of fetal tissue leads to a decrease in levels of free thiamine in the abdominal muscle of the acceptor. Transplantation of tissues of rats per litter reduces the levels of free thiamine in all tissues examined.

Keywords: allotransplantation, graft, thiamine, muscle tissue.

Поступила в редакцию 11.09.2012 г.

Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского
Серия «Биология, химия». Том 25 (64). 2012. № 3. С. 66-73.

УДК 595.44 (477.75)

**ПЕРВЫЕ ДАННЫЕ О ВИДОВОМ СОСТАВЕ ПАУКОВ
(ARACHNIDA, ARANEI) КАЗАНТИПСКОГО ПРИРОДНОГО ЗАПОВЕДНИКА
(КРЫМ)**

Ковблюк Н.М.

Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Украина
E-mail: kovblyuk@mail.ru

В Казантипском природном заповеднике найдено 39 видов пауков. Вид *Ero flammeola* Simon, 1881 (Mimetidae) впервые отмечен для бывшего Советского Союза, Украины и Крыма.

Ключевые слова: пауки, Aranei, аннотированный список, Mimetidae, *Ero flammeola*.

ВВЕДЕНИЕ

В мире сейчас известно более 42 000 видов пауков [1], на территории б.СССР – 3213 видов по состоянию на 2008 г. [2], на Украине – 936 видов (то же), в Крыму – 533 вида [3].

На территории Крыма есть 7 природных заповедников: 1) Крымский; 2) его филиал «Лебяжьи острова»; 3) Ялтинский горно-лесной; 4) «Мыс Мартыян»; 5) Карадагский; 6) Опукский; 7) Казантипский. Относительно неплохо изучены только пауки Карадага. Тут известно 259 видов (с учётом данных, находящихся в печати). Второе место в Крыму по количеству известных видов пауков (140) занимает заповедник «Мыс Мартыян». На третьем месте – Ялтинский горно-лесной природный заповедник (134 вида – материалы были переданы в Летопись природы), что явно в 2-3 раза меньше их реального количества. В Крымском заповеднике известно ещё меньше – всего 72 вида (материалы есть в летописи природы). С территории Опука известно около 10 видов, а с Лебяжьих островов и Казантипа – ни одного.

Поэтому первые сведения о видовом составе пауков Казантипского заповедника актуальны.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Цель работы – представить результаты обработки небольших случайных сборов пауков с территории Казантипского природного заповедника и тем самым положить начало инвентаризации видового состава пауков этого заповедника.

Материал собран во время эпизодических выездов на Казантип в 1998-2011 гг. Использовался только ручной метод сбора. Методы массового сбора (почвенные

ловушки Барбера, энтомологическое кошение, просеивание подстилки) не применялись.

Ниже приводится аннотированный список видов пауков, обнаруженных на Казантипе. Семейства, рода и виды приводятся в алфавитном порядке. Большая часть материала хранится в арахнологической коллекции кафедры зоологии Таврического национального университета. После аббревиатуры места хранения (TNU) приводятся инвентарные номера экземпляров в коллекции. Небольшая часть материала хранится в личной коллекции Е.М. Жуковца (Минск, Беларусь). Эта коллекция обозначена аббревиатурой EMZ.

АННОТИРОВАННЫЙ СПИСОК ПАУКОВ, ОБНАРУЖЕННЫХ В КАЗАНТИПСКОМ ПРИРОДНОМ ЗАПОВЕДНИКЕ

Семейство Agelenidae

Род *Agelena* Walckenaer, 1805

1. *Agelena orientalis* C.L.Koch, 1837

Материал. Мыс Казантип, 17.07.2008, 1 ♂ (О.В. Кукушкин) (TNU-3013/3).

Род *Tegenaria* Latreille, 1804

2. *Tegenaria agrestis* (Walckenaer, 1802)

Материал. Мыс Казантип, 5-6.10.1999, 1 ♀ (Ковблюк) (EMZ).

Семейство Araneidae

Род *Aculepeira* Chamberlin et Ivie, 1942

3. *Aculepeira armida* (Savigny et Audouin, 1826)

Материал. Мыс Казантип, разнотравно-ковыльная степь, 7.06.2003, 3 ♀ (О.В. Кукушкин) (TNU-3012/4); восточная часть мыса Казантип, 16.07.2003, 2 ♀ (О.В. Кукушкин) (TNU-3009/7); мыс Казантип, 23.06.2004, 1 ♂, 1 ♀ (О.В. Кукушкин) (TNU-3010/11); мыс Казантип, 17.07.2008, 2 ♀ (О.В. Кукушкин) (TNU-3013/7).

Род *Agalenataea* Archer, 1951

4. *Agalenataea redii* (Scopoli, 1763)

Материал. Мыс Казантип, западная часть котловины, кошение по разнотравью, 7.06.1999, 2 ♀ (Ковблюк) (EMZ); мыс Казантип, западная часть внутренней стороны котла, типчаково-ковыльно-разнотравная петрофитная степь, кошение, 8.06.1999, 2 ♀ (Ковблюк) (EMZ); мыс Казантип, разнотравно-ковыльная степь, 7.06.2003, 1 ♀ (О.В. Кукушкин) (TNU-3012/3); мыс Казантип, 27.05.2004, 1 ♀ (О.В. Кукушкин) (TNU-3016/3); мыс Казантип, 23.06.2004, 1 ♀ (О.В. Кукушкин) (TNU-3010/9).

Род *Araneus* Clerck, 1758

5. *Araneus circe* (Savigny et Audouin, 1826)

Материал. Мыс Казантип, 23.06.2004, 1 ♂, 1 ♀ (О.В. Кукушкин) (TNU-3010/12).

6. *Araneus diadematus* Clerck, 1758

Материал. Северо-восточная часть мыса Казантип, 15-16.10.1998, 2 ♀ (Ковблюк) (EMZ).

Под *Argiope* Savigny et Audouin, 1826

7. *Argiope bruennichi* (Scopoli, 1772)

Материал. Северо-восточная часть мыса Казантип, 15-16.10.1998, 1 ♀ (Ковблюк) (EMZ); восточная часть мыса Казантип, 16.07.2003, 3 ♀ (О.В. Кукушкин) (TNU-3009/6); мыс Казантип, 17.07.2008, 1 ♀ (О.В. Кукушкин) (TNU-3013/5); мыс Казантип, 18.07.2008, 1 ♀ (О.В. Кукушкин) (TNU-3014/2).

Под *Larinoides* Caporiacco, 1934

8. *Larinoides suspicax* (O. P.-Cambridge, 1876)

Материал. Мыс Казантип, западная часть котловины, кошение по разнотравью, 7.06.1999, 1 ♀ (Ковблюк) (EMZ); мыс Казантип, северо-западная часть наружной стороны котла, типчаково-ковыльно-разнотравная петрофитная степь с кустами боярышника и шиповника, кошение, 8.06.1999, 2 ♂, 1 ♀ (Ковблюк) (EMZ); мыс Казантип, 27.05.2004, 1 ♀ (О.В. Кукушкин) (TNU-3016/4); мыс Казантип, 17.07.2008, 1 ♀ (О.В. Кукушкин) (TNU-3013/9).

Под *Mangora* O. Pickard-Cambridge, 1889

9. *Mangora acalypha* (Walckenaer, 1802)

Материал. Мыс Казантип, северо-западная часть наружной стороны котла, типчаково-ковыльно-разнотравная петрофитная степь с кустами боярышника и шиповника, кошение, 8.06.1999, 1 ♀ (Ковблюк) (EMZ); мыс Казантип, разнотравно-ковыльная степь, 7.06.2003, 1 ♀ (О.В. Кукушкин) (TNU-3012/2); мыс Казантип, 17.07.2008, 1 ♀ (О.В. Кукушкин) (TNU-3013/6).

Под *Neoscona* Simon, 1864

10. *Neoscona adianta* (Walckenaer, 1802)

Материал. Мыс Казантип, 23.06.2004, 1 ♀ (О.В. Кукушкин) (TNU-3010/10); мыс Казантип, 17.07.2008, 9 ♀ (О.В. Кукушкин) (TNU-3013/8).

Семейство Cheiracanthiidae

Под *Cheiracanthium* C.L.Koch, 1839

11. *Cheiracanthium elegans* Thorell, 1875

Материал. Мыс Казантип, разнотравно-ковыльная степь, 7.06.2003, 1 ♂ (О.В. Кукушкин) (TNU-3012/5); мыс Казантип, 23.06.2004, 2 ♂ (О.В. Кукушкин) (TNU-3010/7).

Семейство Dysderidae

Под *Dysdera* Latreille, 1804

12. *Dysdera crocata* C.L.Koch, 1838

Материал. Северо-восточная часть мыса Казантип, под камнями, 15-16.10.1998, 2 ♀ (Ковблюк) (EMZ).

Семейство Gnaphosidae

Род *Drassodes* Westring, 1851

13. *Drassodes lapidosus* (Walckenaer, 1802)

Материал. Мыс Казантип, разнотравно-ковыльная степь, 7.06.2003, 1 ♀ (О.В. Кукушкин) (TNU-3012/7); мыс Казантип, 27.05.2004, 1 ♂ (О.В. Кукушкин) (TNU-3016/2); западная часть мыса Казантип, 7.06.2004, 2 ♀ (О.В. Кукушкин) (TNU-3011/4); мыс Казантип, 23.06.2004, 1 ♀ (О.В. Кукушкин) (TNU-3010/5).

Род *Leptodrassex* Murphy, 2007

14. *Leptodrassex memorialis* (Spassky, 1940)

Материал. Западная часть мыса Казантип, 7.06.2004, 1 ♂ (О.В. Кукушкин) (TNU-3011/3).

Род *Micaria* Westring, 1851

15. *Micaria albovittata* (Lucas, 1846)

Материал. Мыс Казантип, разнотравно-ковыльная степь, 7.06.2003, 1 ♀ (О.В. Кукушкин) (TNU-3012/10).

Род *Trachyzelotes* Lohmander, 1944

16. *Trachyzelotes malkini* Platnick, Murphy, 1984

Материал. Мыс Казантип, разнотравно-ковыльная степь, 7.06.2003, 1 ♀ (О.В. Кукушкин) (TNU-3012/9).

Род *Zelotes* Gistel, 1848

17. *Zelotes gracilis* (Canestrini, 1868)

Материал. Мыс Казантип, разнотравно-ковыльная степь, 7.06.2003, 1 ♂ (О.В. Кукушкин) (TNU-3012/11).

Семейство Linyphiidae

Род *Microlinyphia* Gerhardt, 1928

18. *Microlinyphia pusilla* (Sundevall, 1830)

Материал. Мыс Казантип, 23.06.2004, 1 ♂ (О.В. Кукушкин) (TNU-3010/13).

Семейство Liocranidae

Род *Agroeca* Westring, 1861

19. *Agroeca cuprea* Menge, 1873

Материал. Северо-восточная часть мыса Казантип, под камнями, 15-16.10.1998, 1 ♂ (Ковблюк) (EMZ); Мыс Казантип, разнотравно-ковыльная степь, 7.06.2003, 1 ♀ (О.В. Кукушкин) (TNU-3012/6).

Семейство Lycosidae

Род *Alopecosa* Simon, 1885

20. *Alopecosa solitaria* (O.Hermann, 1879)

Материал. Мыс Казантип, вершина возвышенности, 90-106 м н.у.м., 24-26.04.2010, 1 ♀ (О.В. Кукушкин) (TNU-3015/1); мыс Казантип, 29.09.2011, 1 ♂ (Е.В. Гладилина) (TNU-3019/1).

Род *Arctosa* C.L.Koch, 1847

21. *Arctosa leopardus* (Sundevall, 1832)

Материал. Мыс Казантип, 23.06.2004, 1 ♀ (О.В. Кукушкин) (TNU-3010/8).

Род *Geolycosa* Montgomery, 1904

***Geolycosa vultuosa* (C.L.Koch, 1838)**

Материал. Мыс Казантип, в норке глубиной 200 мм и диаметром 15 мм, 1.03.1997, 1 ♀ (А.Л. Сергеенко) (EMZ).

Род *Hogna* Simon, 1885

22. *Hogna radiata* (Latreille, 1817)

Материал. Мыс Казантип, 5-6.10.1999, 1 ♀ (Ковблюк) (EMZ); восточная часть мыса Казантип, 16.07.2003, 1 ♂ (О.В. Кукушкин) (TNU-3009/8); мыс Казантип, 17.07.2008, 1 ♂ (О.В. Кукушкин) (TNU-3013/4).

Семейство Mimetidae

Род *Ero* C.L. Koch, 1837

23. *Ero flammeola* Simon, 1881

Материал. Восточная часть мыса Казантип, 16.07.2003, 1 ♀ (О.В. Кукушкин) (TNU-3009/9).

Замечание. Вид впервые отмечен для бывшего Советского Союза, Украины и Крыма. До сих пор был известен только из Алжира, Канарских островов, Португалии, Испании, Италии, Греции [4]. Крым (новая находка) – самая восточная точка распространения этого вида.

Семейство Oxyopidae

Род *Oxyopes* Latreille, 1804

24. *Oxyopes heterophthalmus* (Latreille, 1804)

Материал. Мыс Казантип, западная часть котловины, кошение по разнотравью, 7.06.1999, 7 ♂, 2 ♀ (Ковблюк) (EMZ); мыс Казантип, западная часть внутренней стороны котла, типчаково-ковыльно-разнотравная петрофитная степь, кошение, 8.06.1999, 7 ♂, 1 ♀ (Ковблюк) (EMZ); восточная часть мыса Казантип, 16.07.2003, 1 ♀ (О.В. Кукушкин) (TNU-3009/3); мыс Казантип, 23.06.2004, 1 ♀ (О.В. Кукушкин) (TNU-3010/3).

Семейство Pholcidae

Род *Pholcus* Walckenaer, 1805

25. *Pholcus crassipalpis* Spassky, 1937

Материал. Мыс Казантип, разнотравно-ковыльная степь, 7.06.2003, 5 ♂, 15 ♀ (О.В. Кукушкин) (TNU-3012/8); восточная часть мыса Казантип, 16.07.2003, 1 ♂, 1 ♀ (О.В. Кукушкин) (TNU-3009/2); мыс Казантип, 27.05.2004, 4 ♂, 2 ♀ (О.В. Кукушкин) (TNU-3016/5); западная часть мыса Казантип, 7.06.2004, 1 ♂, 4 ♀ (О.В. Кукушкин) (TNU-3011/5); мыс Казантип, 23.06.2004, 2 ♂, 8 ♀ (О.В. Кукушкин) (TNU-3010/4).

Род *Spermophora* Hentz, 1841

26. *Spermophora senoculata* (Duges, 1836)

Материал. Мыс Казантип, 27.05.2004, 1 ♀ (О.В. Кукушкин) (TNU-3016/6).

Семейство Pisauridae

Род *Pisaura* Simon, 1885

27. *Pisaura mirabilis* (Clerck, 1758)

Материал. Мыс Казантип, западная часть котловины, кошение по разнотравью, 7.06.1999, 1 ♀ (Ковблюк) (EMZ); мыс Казантип, северо-западная часть наружной стороны котла, типчаково-ковыльно-разнотравная петрофитная степь с кустами боярышника и шиповника, кошение, 8.06.1999, 1 ♀ (Ковблюк) (EMZ); мыс Казантип, разнотравно-ковыльная степь, 7.06.2003, 1 ♀ (О.В. Кукушкин) (TNU-3012/1); западная часть мыса Казантип, 7.06.2004, 2 ♀ (О.В. Кукушкин) (TNU-3011/1); мыс Казантип, 23.06.2004, 1 ♀ (О.В. Кукушкин) (TNU-3010/1); мыс Казантип, 17.07.2008, 2 ♀ (О.В. Кукушкин) (TNU-3013/2); мыс Казантип, 18.07.2008, 1 ♀ (О.В. Кукушкин) (TNU-3014/1).

Семейство Salticidae

Род *Heliophanus* C.L.Koch, 1833

28. *Heliophanus kochii* Simon, 1868

Материал. Западная часть мыса Казантип, 7.06.2004, 2 ♀ (О.В. Кукушкин) (TNU-3011/6).

Род *Pseudeuophrys* F.Dahl, 1912

29. *Pseudeuophrys obsoleta* (Simon, 1868)

Материал. Мыс Казантип, 27.05.2004, 1 ♀ (О.В. Кукушкин) (TNU-3016/7).

Род *Synageles* Simon, 1876

30. *Synageles scutiger* Proszynski, 1979

Материал. Мыс Казантип, северо-западная часть наружной стороны котла, типчаково-ковыльно-разнотравная петрофитная степь с кустами боярышника и шиповника, кошение, 8.06.1999, 1 ♀ (Ковблюк) (EMZ); мыс Казантип, западная часть внутренней стороны котла, типчаково-ковыльно-разнотравная петрофитная степь, кошение, 8.06.1999, 1 ♀ (Ковблюк) (EMZ).

Семейство Theridiidae

Род *Latrodectus* Walckenaer, 1805

31. *Latrodectus tredecimguttatus* (Rossi, 1790)

Материал. Восточная часть мыса Казантип, 16.07.2003, 2 ♂ (О.В. Кукушкин) (TNU-3009/1).

Род *Parasteatoda* Archer, 1946

32. *Parasteatoda tepidariorum* (C.L.Koch, 1841)

Материал. Мыс Казантип, 18.07.2008, 1 ♀ (О.В. Кукушкин) (TNU-3014/3).

Род *Steatoda* Sundevall, 1833

33. *Steatoda paykulliana* (Walckenaer, 1806)

Материал. Мыс Казантип, 23.06.2004, 1 ♀ (О.В. Кукушкин) (TNU-3010/6).

34. *Steatoda triangulosa* (Walckenaer, 1802)

Материал. Мыс Казантип, 27.05.2004, 1 ♀ (О.В. Кукушкин) (TNU-3016/1).

Семейство Thomisidae

Род *Heriaeus* Simon, 1875

35. *Heriaeus mellotteei* Simon, 1886

Материал. мыс Казантип, северо-западная часть наружной стороны котла, типчаково-ковыльно-разнотравная петрофитная степь с кустами боярышника и шиповника, кошение, 8.06.1999, 4 ♂, 1 ♀ (Ковблюк) (EMZ).

Род *Misumena* Latreille, 1804

36. *Misumena vatia* (Clerck, 1758)

Материал. Восточная часть мыса Казантип, 16.07.2003, 1 ♀ (О.В. Кукушкин) (TNU-3009/5).

Род *Ozyptila* Simon, 1864

37. *Ozyptila atomaria* (Panzer, 1801)

Материал. Северо-восточная часть мыса Казантип, под камнями, 15-16.10.1998, 1 ♂ (Ковблюк) (EMZ)

Род *Thomisus* Walckenaer, 1805

38. *Thomisus onustus* Walckenaer, 1805

Материал. Мыс Казантип, западная часть котловины, кошение по разнотравью, 7.06.1999, 2 ♂, 2 ♀ (Ковблюк) (EMZ); мыс Казантип, северо-западная часть наружной стороны котла, типчаково-ковыльно-разнотравная петрофитная степь с кустами боярышника и шиповника, кошение, 8.06.1999, 3 ♂ (Ковблюк) (EMZ); мыс Казантип, западная часть внутренней стороны котла, типчаково-ковыльно-разнотравная петрофитная степь, кошение, 8.06.1999, 8 ♂, 1 ♀ (Ковблюк) (EMZ); восточная часть мыса Казантип, 16.07.2003, 3 ♀ (О.В. Кукушкин) (TNU-3009/4); западная часть мыса Казантип, 7.06.2004, 4 ♂, 4 ♀ (О.В. Кукушкин) (TNU-3009/5).

3011/2); мыс Казантип, 23.06.2004, 1 ♀ (О.В. Кукушкин) (TNU-3010/2); мыс Казантип, 17.07.2008, 2 ♀ (О.В. Кукушкин) (TNU-3013/1).

Семейство Zodariidae

Род *Zodarion* Walckenaer in Savigny et Audouin, 1826

39. *Zodarion morosum* Denis, 1935

Материал. Северо-восточные склоны мыса Казантип, 5.10.1999, 1 ♀ (Ковблюк) (TNU-3020/1).

ВЫВОДЫ

1. В Казантипском природном заповеднике найдено 39 видов пауков.
2. Вид *Ero flammeola* Simon, 1881 (Mimetidae) впервые отмечен для бывшего Советского Союза, Украины и Крыма.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор в высшей степени признателен Е.В. Гладилиной (Симферополь), А.Л. Сергеенко (пгт. Никита, Ялта) и особенно О.В. Кукушкину (Карадагский природный заповедник) за сборы пауков на Казантипе.

Список литературы

1. Platnick N.I. The world spider catalog, version 12.5 [Электронный ресурс]. / N.I. Platnick // American Museum of Natural History, 2012. – Режим доступа: <http://research.amnh.org/iz/spiders/catalog>.
2. Фауна пауков России и соседних территорий: итоги изучения / К.Г. Михайлов // Проблемы почвенной зоологии. Материалы XVI Всероссийского совещания по почвенной зоологии. Под ред. Б.Р. Стригановой. – Москва: Товарищество научных изданий КМК, 2011. – С. 83.
3. Ковблюк Н.М. Каталог пауков Крыма (Arachnida: Aranei), версия 1.0. (11.11.2011). / Н.М. Ковблюк // 2011. – Режим доступа: http://arachnology.kz/Crimea/main_Crimea.htm.
4. Thaler K. Pirate spiders of the genus *Ero* C.L. Koch from southern Europe, Yemen, and Ivory Coast, with two new species (Arachnida, Araneae, Mimetidae) / K. Thaler, A. van Harten, B. Knoflach // Denisia. – 2004. – Vol. 13. – P. 359-368.

Ковблюк М.М. Перші відомості про видовий склад павуків (Arachnida, Aranei) Казантипського природного заповідника (Крим) / М.М. Ковблюк // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2012. – Т. 25 (64), № 3. – С. 66-73.

В Казантипському природному заповіднику знайдено 39 видів павуків. Вид *Ero flammeola* Simon, 1881 (Mimetidae) вперше відмічений для колишнього Радянського Союзу, України та Криму.

Ключові слова: павуки, Aranei, аннотований список, Mimetidae, *Ero flammeola*.

Kovblyuk M.M. The first data about species composition of spiders (Arachnida, Aranei) in Kazantip Nature Reserve (Crimea) / M.M. Kovblyuk // Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No 3. – P. 66-73.

There are 39 spider species recorded from the Kazantip Nature Reserve. *Ero flammeola* Simon, 1881 (Mimetidae) is the new record for the former Soviet Union, Ukraine and Crimea.

Keywords: spiders, Aranei, check-list, Mimetidae, *Ero flammeola*.

Поступила в редакцию 12.09.2012 г.

Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского
Серия «Биология, химия». Том 25 (64). 2012. № 3. С. 74-80.

УДК 577.213.3:597.55

**ИЗМЕНЧИВОСТЬ RAPD-PCR СПЕКТРОВ ДНК МОРСКОГО ЕРША
В СЕВАСТОПОЛЬСКИХ БУХТАХ С РАЗНОЙ СТЕПЕНЬЮ
АНТРОПОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ**

Королёва А.В., Симчук А.П.

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

Проведены исследования изменчивости ДНК нервной ткани (головной мозг) морского ерша. Выявлены особенности ДНК-спектров нервной ткани морского ерша. Изучение особенностей ДНК-спектров нервной ткани рыб может способствовать оценке физиолого-биохимического состояния рыб и среди их обитания.

Ключевые слова: морской ерш, ДНК-спектры, ДНК-фрагменты, полимеразная цепная реакция, нервная ткань, антропогенная нагрузка.

ВВЕДЕНИЕ

Геном живых организмов подвергается постоянной атаке различных физических (ультрафиолетовая и ионизирующая радиация) и химических (генотоксические и канцерогенные вещества) факторов как окружающей среды, так и продуктов собственного метаболизма (свободные радикалы), которые могут повреждать ДНК клеток. Повышение уровня загрязнения окружающей среды генотоксическими веществами приводит к накоплению повреждений ДНК и угнетению систем репарации [1].

Установлено, что при хроническом воздействии вредных химических веществ на организм выявляемые изменения отдельных показателей его жизнедеятельности достоверно отличаются от соответствующих показателей физиологической нормы [2, 3].

Повышение уровня загрязнения окружающей среды генотоксическими веществами приводит к накоплению повреждений ДНК и угнетению систем репарации [1]. Разнообразные повреждения ДНК, или так называемые ДНК-аддукты, могут возникать спонтанно либо под действием внешних факторов. ДНК представляет собой огромную мишень для различного рода повреждающих факторов [4].

Среди различных технологий маркирования генома наиболее эффективными являются методы полимеразной цепной реакции. ДНК-маркеры, полученные с помощью данного метода, успешно применяются для выявления индивидуальной и популяционной изменчивости организмов, для определения видовой принадлежности отдельной особи, а также для оценки темпа мутаций,

индуцированных радиационным или химическим загрязнением окружающей среды [5, 6, 7]. Данным методом можно оценить и уровень внутрипопуляционной генетической изменчивости. Мономорфизм обычно связывают с жестким естественным отбором [8]. Кроме того, загрязнение морской воды может в значительной степени нивелировать микрогетерогенность условий существования организмов, а также служить дополнительным фактором отбора, усиливая его давление. Следовательно, загрязнение морских экосистем должно оказывать влияние на уровень полиморфизма в популяциях морских организмов.

В связи с вышеизложенным, настоящая работа посвящена исследованию изменчивости ДНК-спектров морского ерша в условиях разной степени загрязнения среды его обитания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования был выбран донный вид рыб – морской ерш (*Scorpaena porcus* L.), отловленный в прибрежной части Черного моря в районе г. Севастополя. Данный вид полностью отвечает требованиям, предъявляемым к биомониторным объектам: повсеместное распространение в водоеме, хорошо изученная биология, не совершает длительных миграций. Материалом для исследования служил гомогенат мозга морского ерша.

Для экстракции ДНК использовали комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ». Для проведения амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб использовали ПЦР-смесь с Таq-полимеразой («АмплиСенс-200-1»). Амплификацию проводили в автоматическом режиме на программируемом амплификаторе с использованием приема «горячий старт». При этом пробирки с реагентами помещали в амплификатор, нагретый до температуры 93-94°C. Данный прием позволяет избежать неспецифического отжига праймеров [9].

Продукты амплификации исследовали методом горизонтального электрофореза в 2% агарозном геле в трис-богротном буфере с добавлением бромистого этидия. Это вещество встраивается в двухцепочечную молекулу ДНК и флуоресцирует в ультрафиолетовом свете [9]. В таком виде ДНК-фрагменты были зафиксированы на цифровой фотоаппарат и проанализированы.

Сравнительный анализ полученных спектров осуществляли качественно и количественно. Статистическая обработка данных производилась с помощью стандартной программы «EXCEL-2010».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследований был подобран наиболее информативный праймер для проведения ПЦР-анализа ДНК морского ерша. Им оказался стандартный праймер Olig-14 с нуклеотидной последовательностью CACGGCGAGT.

Далее был проведен анализ вариабельности случайно амплифицированной ДНК методом RAPD-PCR со стандартным 10-нуклеотидным праймером Olig-14. RAPD-PCR (Random amplified polymorphic DNA PCR) – это ПЦР со случайной амплификацией полиморфной ДНК — используется для изучения изменчивости

близких по генетической последовательности организмов, например, разных сортов культурных растений, пород собак или близкородственных микроорганизмов. В этом методе обычно используют один праймер небольшого размера (около 10 п.н.). Этот праймер может оказаться частично комплементарным случайному участкам ДНК исследуемых организмов.

Результаты исследований влияния антропогенных факторов на особенности ДНК-спектров мозга морского ерша, полученных методом ПЦР-анализа, представлены на рисунках 1 – 3.

Проведенные исследования показали, что ДНК-спектр морского ерша, отловленного в Стрелецкой бухте, содержит в себе 11 случайно амплифицированные ДНК-фрагментов длиной от 180 до 1000 пар нуклеотидов (рис. 1.).

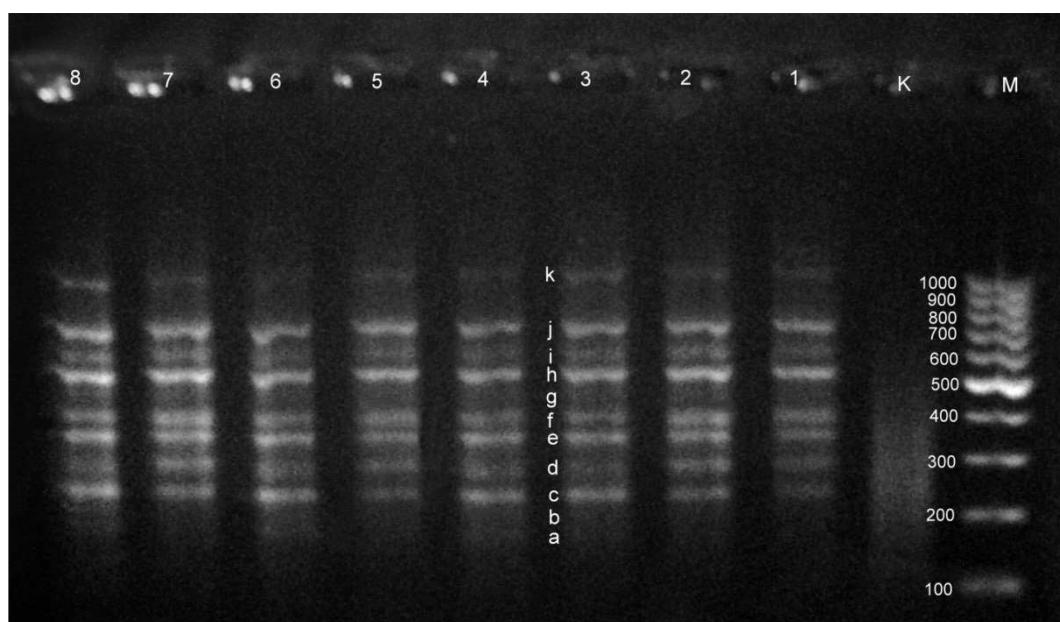


Рис. 1. RAPD-PCR-спектры морского ерша, отловленного в Стрелецкой бухте

Не у всех особей ДНК-спектры идентичны. Так, фрагменты *a* длиной 180 п.н. и *b* длиной 210 п.н. присутствуют только у четырех особей. ДНК-фрагмент *g*, длина которого составляет 430 п.н., входит в состав только двух ДНК-спектров: у особей под номером 3 и 9.

Необходимо отметить, что фрагмент *h* длиной 550 п.н. является наиболее ярко выраженным во всех ДНК-спектрах. А ДНК-фрагменты, присутствующие только у отдельных особей, такие как *g*, *b* и *a* могут служить маркерами различных процессов и характеристик, отличающих данные особи.

При изучении ДНК-спектров скорпен, выловленных в Карантинной бухте, было обнаружено 8 ДНК-фрагментов длиной от 210 до 790 п.н. (рис. 2.).

Как и в предыдущем исследовании, были обнаружены отличия между ДНК-спектрами разных особей. Так, фрагмент *b* длиной 210 п.н. присутствует у двух особей морского ерша (под номером 4 и 5), а фрагмент *j* длиной 790 п.н. отсутствует только у особи под номером 6. ДНК-фрагмент длиной 300 п.н. (*d*) отмечен у половины исследуемых особей морского ерша. А ДНК-фрагменты длиной 370 (*e*), 400 (*f*) и 550 (*h*) п.н. ярко выражены у всех исследуемых особей. Фрагмент *a* также найден во всех ДНК-спектрах, однако ярко выражен только у двух особей (4 и 5).

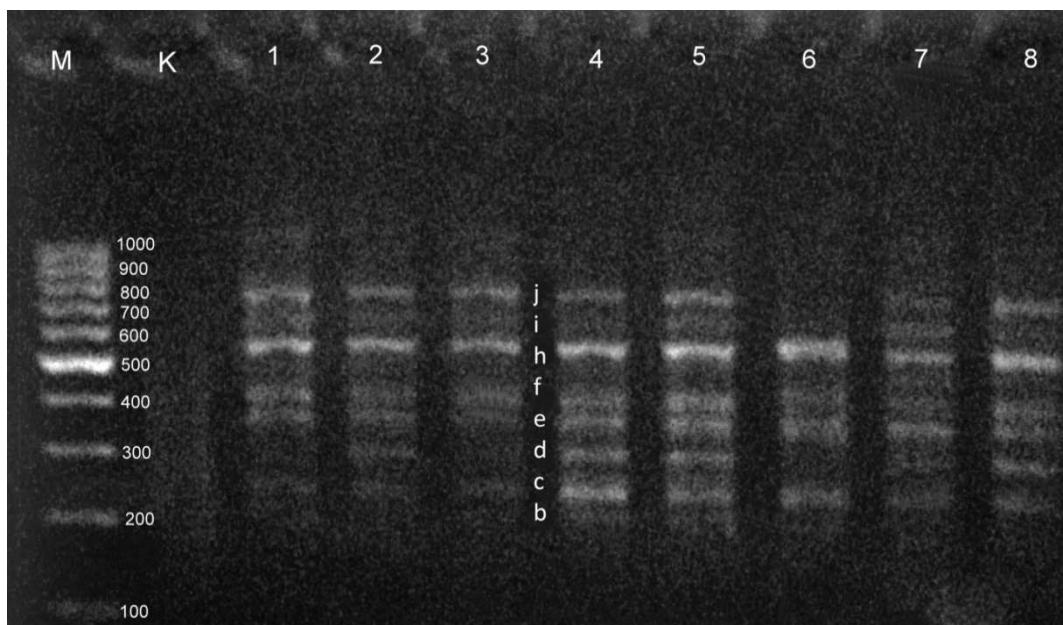


Рис. 2. RAPD-PCR-спектры морского ерша, отловленного в Карантинной бухте

В ДНК-спектрах морского ерша, отловленного в Карантинной бухте, также обнаружен наиболее ярко выраженный ДНК-фрагмент *h* длиной 550 п.н. А ДНК-фрагменты *b* и *d*, присутствующие лишь у отдельных особей, могут служить маркерами различных процессов и характеристик, отличающих данные особи.

При сравнении ДНК-спектров скорпен, отловленных в Стрелецкой и Карантинной бухтах, выяснилось, что все ДНК-фрагменты, наработанные у особей из Карантинной, встречаются и у особей из Стрелецкой, что подтверждает их безусловное родство. Однако отмечены и некоторые различия, которые, прежде всего, проявились в общем количестве наработанных ДНК-фрагментов (у особей из Стрелецкой отмечено большее количество – 11) и в различных пределах длин пар нуклеотидов: у особей из Карантинной отмечены меньшие пределы (210 – 790 п.н.) по сравнению с особями из Стрелецкой (180 – 1000 п.н.). Некоторые характерные ДНК-фрагменты скорпен, отловленных в Стрелецкой бухте, встречаются лишь у нескольких особей. Таким образом, можно сделать вывод, что особи из популяции ерша Стрелецкой бухты характеризуются большим числом фрагментов ДНК, а

популяция этого вида из Карантинной бухты отличается большей внутрипопуляционной, индивидуальной изменчивостью.

В ходе анализа ДНК-спектров было выполнено сравнение по частоте встречаемости ДНК-фрагментов у особей из разных бухт. Четыре фрагмента встречаются у всех особей исследуемых групп – это фрагменты *c, e, f* и *h* (рис. 3). Частота встречаемости данных фрагментов составляет 100%. Практически у всех скорпен отмечен фрагмент *j* – 90% у особей из Карантинной бухты и 100% у особей из Стрелецкой. ДНК-фрагменты *i* и *d* обнаружены у всех особей из Стрелецкой бухты, а у особей из Карантинной частота встречаемости этих фрагментов составила 70 и 50% соответственно. Довольно редко у скорпен обеих групп встречается фрагмент *b* (у особей из Карантинной бухты 20%, из Стрелецкой – 40%). Частота встречаемости ДНК-фрагментов *g* и *a* у особей из Стрелецкой бухты составляет 20 и 40% соответственно, а у морского ерша, отловленного в Карантинной бухте, данные фрагменты не обнаружены.

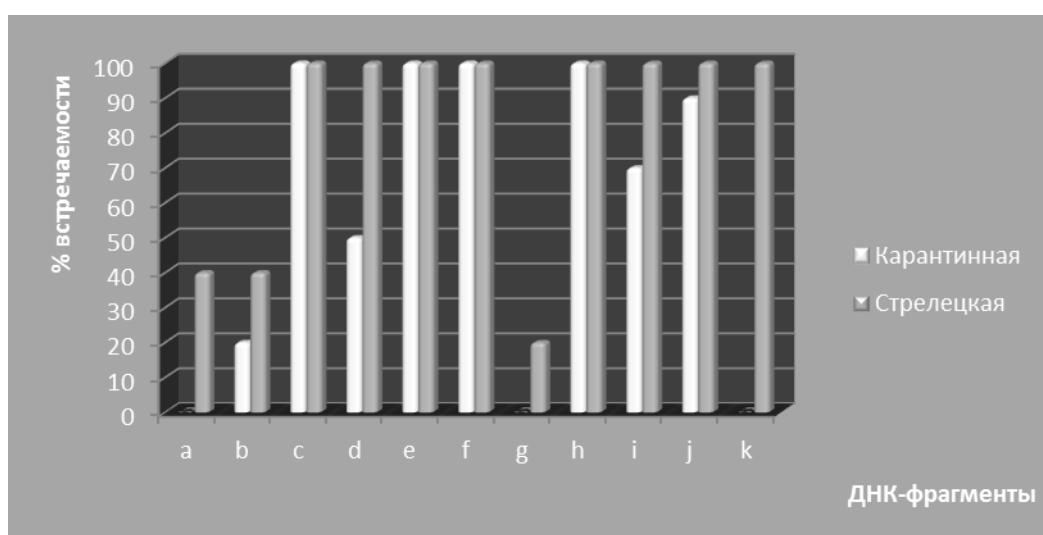


Рис. 3. Частота встречаемости ДНК-фрагментов скорпен, отловленных в бухтах с различным уровнем загрязненности

Наиболее интересным фрагментом в данных ДНК-спектрах является фрагмент *k* длиной 1000 п.н.. Он отмечен у всех особей из Стрелецкой бухты (100%-ая частота встречаемости) и отсутствует у рыб из Карантинной бухты.

Предполагается, что RAPD-маркеры локализованы в основном в некодирующей области ДНК, поскольку она составляет подавляющую часть генома эукариот. Скорость же мутирования в некодирующей ДНК примерно вдвое выше, чем в кодирующей [10]. К тому же RAPD-маркеры иногда амплифицируются из регионов повторяющейся ДНК [11] и, таким образом, могут отражать высокие скорости их мутирования, которое может быть индуцировано радиационным или химическим загрязнением окружающей среды.

В ходе анализа полученных методом полимеразной цепной реакции ДНК-спектров рыб, отловленных в бухтах с разным уровнем загрязнения, были обнаружены как полиморфные, так и мономорфные ДНК. Инвариантные RAPD-маркеры, не показывающие индивидуальной и географической изменчивости. Такую ДНК предложено отличать от полиморфной и рассматривать как проявление генетического мономорфизма на уровне ДНК [12]. В ДНК-спектрах рыб обоих выборок такой мономорфный маркер был обнаружен. Это ДНК-фрагмент *h* длиной 550 п.н., ярко выраженный у всех изученных особей данного вида. Полиморфными ДНК-маркерами, которые могут отвечать за различные характеристики отдельных особей, явились ДНК-фрагменты *a*, *b*, *g* у особей из Стрелецкой бухты и *b*, *d*, *i* – у особей из Карантинной.

Наиболее интересный ДНК-фрагмент *k*, длиной 1000 п.н., который обнаружен у всех особей из Стрелецкой бухты (100%-ая частота встречаемости) и отсутствует у рыб из Карантинной бухты. Следует отметить, что Карантинная бухта в значительно большей степени подвержена антропогенному воздействию (дать ссылку, или объяснить почему). Вполне вероятно, что данный ДНК фрагмент распространился среди рыб популяции Карантинной бухты именно вследствие влияния загрязнений. Мономорфизм часто является результатом жесткого естественного отбора [8]. Именно таким образом, вызванным загрязнением окружающей среды, можно объяснить единобразие ДНК спектров рыб, обитающих в Карантинной бухте. Дальнейшее исследование этого вопроса позволит выявить ДНК-маркеры загрязнения морских вод. Анализ уровня внутрипопуляционной изменчивости позволит оценить степень неблагоприятного воздействия загрязнения на популяции рыб и морские экосистемы в целом.

ВЫВОДЫ

1. Выявлены особенности ДНК-спектров морского ерша в двух бухтах, различающихся уровнем загрязнения окружающей среды. Обнаружен уникальный ДНК-фрагмент у особей, обитающих в более загрязненной акватории.
2. ДНК-спектры скорпен, собранных из более загрязненной бухты, характеризуются большей степенью единобразия, что свидетельствует о жестком естественном отборе.

Список литературы

1. Сорочинская У.Б. Применение метода ДНК-комет для оценки повреждений ДНК, вызванных различными агентами окружающей среды / У.Б. Сорочинская, В.М. Михайленко // Онкология. – Т. 10, № 3. – 2008. – С. 303 – 309
2. Басова М.М. Функциональные особенности химического состава печени, мышц и гонад самцов и самок черноморской камбалы // Дисс. канд. биол. наук. – Севастополь. – 2002. – 132 с.
3. Джабаров М.И. Электрофоретическое исследование белков сыворотки крови сазана и шемаи в период созревания гонад / М.И. Джабаров // Экологическая физиология рыб: тез. докл. III Всесоюзн. Конф., Киев, ноябрь, 1976. – К.: Наукова думка, 1976. – С. 136 – 138
4. Райс Р.Х. Повреждение ДНК и репарация. Биологические эффекты токсических соединений: курс лекций / Р.Х. Райс, Л.Ф. Гуляева – Новосибирск: Новосиб. гос. ун-т., 2003. – 208 с.

5. Алтухов Ю.П. Полиморфизм ДНК в популяционной генетике / Ю.П. Алтухов, Е.А. Салменкова // Генетика. – 2002. – Т. 38, № 9. – С. 1173 – 1195
6. Зеленина Д.А. Сравнительные исследования популяционной структуры и определение популяционной принадлежности нерки (*Oncorhynchus nerka*) Западной Камчатки с помощью RAPD-PCR и анализа полиморфизма микросателлитных локусов / Д.А. Зеленина, А.М. Хрусталева, Волков А.А. // Генетика. – 2006. – Т. 42, № 5. – С. 693 – 704. Мейен В.А. К вопросу о годовом цикле изменений яичников костистых рыб // Изв. АН СССР. – 1939. – № 39. – С. 229 – 418
7. Семенова С.К. Индивидуальная и популяционная изменчивость церкарий шистоматид группы *Trichobilharzia ocellata* (Trematoda, Schistomatidae), выявляемая с помощью полимеразной цепной реакции / С.К. Семенова, Хрисанфова Г.Г., Филиппова Е.К. [и др.] // Генетика. – 2005. – Т.41, № 1. – С. 17 – 22
8. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. 2-е изд., перераб. и доп. / Ю.П. Алтухов. – М.: Наука, 1989. – 328 с.
9. Оберемок В.В. Методические рекомендации к применению ПЦР-метода / В.В. Оберемок. – Симферополь: из-во ТНУ, 2008. – 34 с.
10. Nei M. Molecular evolutionary genetic / M. Nei. – N.Y.: Columbia Univ. Press, 1987. – 512 p.
11. Karp A. DNA markers: a global overview / A. Karp, K. Edwards // DNA Markers: Protocols, Applications and Overview / Eds G. Caetano-Anolles, P.M. Gresshoff. – N.Y.: Wiley–VCH, 1997. – Р. 1–13
12. Алтухов Ю.П. Мономорфная видоспецифичная ДНК, выявляемая в полимеразной цепной реакции со случайными праймерами / Ю.П. Алтухов, А.Б. Абрамова // Генетика. – 2000. – Т. 36, № 12. – С. 1674–1681

Корольова Г.В. Мінливість RAPD-PCR спектрів ДНК морського йоржа в севастопольських бухтах з різним ступенем антропогенного забруднення / Г.В. Корольова, А.П. Сімчук // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2012. – Т. 25 (64), № 3. – С. 74-80.

Зроблені дослідження ДНК-спектрів нервової тканини морського йоржа. Були виявлені особливості ДНК-спектрів морського йоржа у двох бухтах, які відрізняються рівнем забруднення навколошнього середовища. Виявлені унікальні ДНК-фрагменти у особей, які мешкають в більш забрудненій акваторії. ДНК-спектри скорпен, які були зібрані із більш забрудненої бухти, характеризуються більшим ступенем однаковості, що свідчить про жорсткий природний відбір.

Ключові слова: морський йорж, ДНК-спектри, ДНК-фрагменти, полімеразна ланцюжкова реакція, нервова тканина, антропогенне навантаження.

Korolyova A.V. The changeable of RAPD-PCR specters DNA of *Scorpaena porcus* in the Sevastopol's bays with different degree of anthropogenic pollution / A.V. Korolyova, A.P. Simchuk // Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No 3. – P. 74-80.

The investigations of DNA-spectres from *Scorpaena porcus*' nervous tissue were made. The DNA-spectres' peculiarities of *Scorpaena porcus* from two bays, which have different level of environment pollution, were ascertained. The uncial DNA-fragments of specieses, which are living in more polluted aquatory, were discvered. The DNA-spectres of *Scorpaena porcus*, which were gathered from more polluted bay, are characterizing of more degree of uniformity, that is testify about hard nature selection.

Keywords: *Scorpaena porcus*, DNA-spectres, DNA-fragments, polymerase chain reaction, nervous tissue, anthropogenic load.

Поступила в редакцию 17.09.2012 г.

УДК 612.014.42:594.1

СЕЗОННАЯ И ИНФРАДИАННАЯ РИТМИКА НОЦИЦЕПЦИИ ИНТАКТНЫХ МОЛЛЮСКОВ *HELIX ALBESCENS*

Костюк А.С.

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

Выявлена сезонная и инфрадианная ритмика ноцицептивной чувствительности моллюсков *Helix albescens*. Наиболее высокие значения параметров ноцицепции у интактных моллюсков зарегистрированы летом, наименьшие – в весенний период. Осенью и зимой зарегистрированы более низкие значения изучаемых параметров, чем в летний сезон, но несколько более высокие, чем весной. Многодневная ритмика показателей ноцицепции включает ритмы продолжительностью от $\approx 2,38$ до $\approx 9,50$ суток. Обнаружена взаимосвязь между сезонной и многодневной ритмикой, проявляющаяся в различиях составов спектров инфрадианной ритмики, а также амплитуд выделенных ритмов. Наименьшее число выделяемых периодов отмечено летом ($n=5$), когда зарегистрированы максимальные значения амплитуд.

Ключевые слова: ноцицепция, инфрадианная ритмика, моллюски, сезон года.

ВВЕДЕНИЕ

Согласно современным представлениям временная организация биологических систем является одной из важнейших характеристик, которая образует спектр в широком диапазоне периодов – от нескольких секунд-минут до нескольких сотен лет. Важным компонентом временной организации является сезонная ритмика.

Сезонная ритмичность физиологических процессов (изменения скорости роста у детей) впервые описана R. Malling-Hausen (1886) [1], спустя тридцать лет J. Lindhard (1917) [2] обнаружены сезонные колебания чувствительности дыхательного центра к CO_2 . К 1962 г. J. Hildebrandt (1962) [3] обобщил сведения о сезонных колебаниях более 30-ти физиологических показателей у людей. Наиболее полные сведения, отражающие современное состояние проблемы сезонной ритмики биологических систем, представлены в монографии А.П. Голикова (1973) [4].

Показано, что в различные сезоны года обнаруживается неодинаковая корреляционная связь между параметрами состояния организма, в частности, биологически активными точками и индексами «космической погоды». Максимальная положительная корреляция выявлена в период с сентября по ноябрь, а с февраля по апрель вероятность выявления достоверных корреляций минимальна [5]. Но если сезонная ритмичность у позвоночных животных изучена достаточно полно, то у беспозвоночных она изучена недостаточно, а многодневная практически не исследована.

В связи с этим целью настоящего исследования было изучение сезонной и инфрадианной ритмики ноцицепции интактных моллюсков *Helix albescens*, адекватно характеризующей функциональное состояние этих животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проведены на наземных брюхоногих моллюсках *Helix albescens*, широко распространенных на территории Крымского полуострова и применяемых в экспериментах для выявления биологической активности разнообразных экологических факторов. Сбор моллюсков производился в поле, вдали от предприятий, линий электропередач.

В эксперименте использовались половозрелые животные, одинаковые по массе и размерам. До эксперимента моллюски не менее одной недели находились в активном состоянии.

Для определения сезонных различий динамики ноцицепции моллюсков было проведено несколько серий экспериментов. Моллюсков содержали в стеклянных аквариумах при температуре $22\pm2^{\circ}\text{C}$, высокой влажности, продолжительности фаз свет-темнота (L:D) 1:23 ч и избыток пищи (капуста, морковь).

О состоянии ноцицептивной чувствительности животных судили по порогу (П) и латентному периоду (ЛП) реакции избегания (РИ) в teste «горячая пластинка». Подробное описание экспериментальной установки для определения параметров ноцицепции, используемой в настоящем исследовании, представлено в наших предыдущих работах [6, 7].

Регистрацию показателей РИ проводили у каждого животного ежедневно в интервале 11:00–12:00 ч в течение 21 дня.

Статистическую обработку и анализ материала проводили с помощью параметрических статистических методов, целесообразность применения которых была показана проверкой полученных данных на закон нормального распределения. Вычисляли средние значения исследуемых величин и ошибку среднего. Для оценки достоверности наблюдаемых изменений использовали t-критерий Стьюдента. В качестве основного метода анализа продолжительности периодов и амплитудно-фазных характеристик исследуемых показателей использовали быстрое преобразование Фурье и программу косинор-анализа (решение систем линейных уравнений методом Крамера), обеспечивающие полное представление о структуре физиологических ритмов [8]. Расчеты и графическое оформление полученных в работе данных проводились с применением программы «Microsoft Excel» и программного пакета «STATISTICA – 6.0» [9, 10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ полученных нами экспериментальных данных выявил выраженную зависимость параметров ноцицептивной чувствительности моллюсков от сезона года.

Наиболее высокие значения П и ЛП РИ при термической стимуляции у моллюсков контрольной группы зарегистрированы летом, когда П колебался от $30,83\pm0,29^{\circ}\text{C}$ до $31,27\pm0,15^{\circ}\text{C}$; ЛП – от $10,36\pm0,44$ с до $11,04\pm0,22$ с (рис. 1).

Наименьшие значения отмечались в весенний период: значения П варьировали в пределах от $30,40 \pm 0,12^\circ\text{C}$ до $30,69 \pm 0,12^\circ\text{C}$, ЛП – от $9,71 \pm 0,18$ с до $10,16 \pm 0,19$ с.

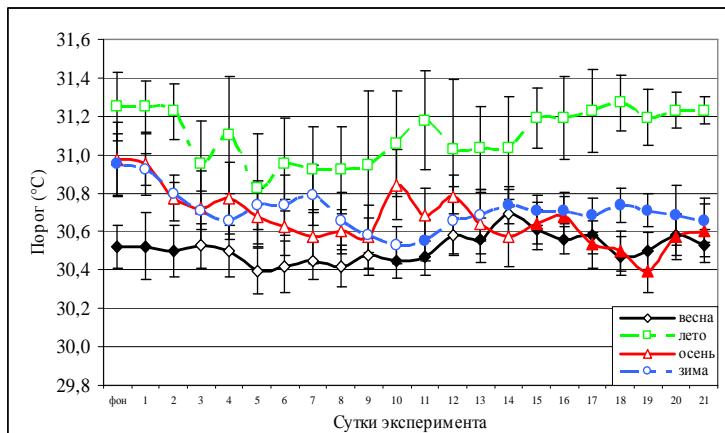


Рис. 1. Динамика ($\bar{x} \pm S_x$) порога ($^\circ\text{C}$) реакции избегания термического стимула интактными моллюсками в различные сезоны года.

Примечание: заштрихованные точки – достоверные различия значений в весенний, осенний и зимний сезоны относительно данных летнего периода.

Осенью и зимой зарегистрированы более низкие значения изучаемых параметров, чем в летний сезон, но несколько более высокие параметры ноцицепции, чем весной. Так, осенью минимального значения исследуемые показатели достигали на 19 сутки исследования, когда снижались относительного фоновых значений П на 1,88%, ЛП – на 8,35%, т.е. составили $30,39 \pm 0,11^\circ\text{C}$ и $9,70 \pm 0,16$ с соответственно. В последующие двое суток отмечалось постепенное возрастание изучаемых показателей. В зимний сезон П колебался в пределах от $30,53 \pm 0,10^\circ\text{C}$ до $30,95 \pm 0,16^\circ\text{C}$ (рис. 1), ЛП – от $9,91 \pm 0,15$ с до $10,55 \pm 0,24$ с.

Следовательно, анализ результатов проведенного исследования показал, что П РИ летом превышал таковой в весенний период от 1,1% до 2,6%, ЛП – от 5,1% до 12,3%; в осенний – П от 0,5% до 2,6%, ЛП от 2,2% до 12,5%; в зимний сезон П от 0,3% до 2,0%, ЛП от 1,3% до 9,5% в течение 21-суточного эксперимента. Достоверные различия показателей ноцицептивной чувствительности моллюсков при термической стимуляции в весенний, осенний и зимний сезоны относительного летнего отмечались с 10 по 21 сутки наблюдения.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о сезонной ритмике ноцицепции моллюсков, т.е. в различные сезоны года абсолютные значения параметров ноцицепции моллюсков *Helix albescens* неодинаковы.

Согласно полученным нами данным важным компонентом временной организации ноцицептивной чувствительности моллюсков является инфрадианская ритмика (ИР), которая также имеет определенные особенности в различные сезоны года.

Применение спектрального преобразования Фурье и косинор-анализа позволило выявить в различные сезоны года набор инфрадианных ритмов, включающий в себя периоды следующей продолжительности: $\approx 2,38$; $\approx 2,76$; $\approx 3,42$; $\approx 3,95$; $\approx 5,35$; $\approx 6,76$; $\approx 7,77$; $\approx 9,50$ суток (табл. 1).

Таблица 1.
Данные спектрального анализа латентного периода интактных моллюсков
***Helix albescens* в различные сезоны года**

	Сезоны года			
	Весна (1)	Лето (2)	Осень (3)	Зима (4)
Период (сутки)	2,42	2,33	2,37	2,37
Амплитуда (усл.ед.)	$0,041 \pm 0,004$	$0,059 \pm 0,006$ $P_{1-2} < 0,01$	$0,030 \pm 0,004$ $P_{2-3} < 0,001$	$0,023 \pm 0,002$ $P_{1-4} < 0,001$ $P_{2-4} < 0,001$
Фаза (радианы)	$1,490 \pm 0,123$	$3,291 \pm 1,040$	$2,728 \pm 1,152$	$1,226 \pm 0,952$
Период (сутки)	2,67	2,61	2,91	2,91
Амплитуда (усл.ед.)	$0,042 \pm 0,005$	$0,054 \pm 0,006$	$0,031 \pm 0,004$ $P_{2-3} < 0,01$	$0,023 \pm 0,003$ $P_{1-4} < 0,001$ $P_{2-4} < 0,001$
Фаза (радианы)	$1,240 \pm 0,005$	$2,247 \pm 0,965$	$1,401 \pm 0,601$	$1,632 \pm 0,831$
Период (сутки)	3,37	---	3,46	3,37
Амплитуда (усл.ед.)	$0,048 \pm 0,005$	---	$0,032 \pm 0,004$ $P_{1,3} < 0,05$	$0,023 \pm 0,003$ $P_{1,4} < 0,001$ $P_{3,4} < 0,05$
Фаза (радианы)	$2,407 \pm 0,662$	---	$2,106 \pm 0,918$	$2,237 \pm 1,179$
Период (сутки)	3,76	3,88	4,13	4,13
Амплитуда (усл.ед.)	$0,041 \pm 0,004$	$0,058 \pm 0,008$	$0,035 \pm 0,004$ $P_{2-3} < 0,01$	$0,026 \pm 0,003$ $P_{1-4} < 0,01$ $P_{2-4} < 0,001$
Фаза (радианы)	$2,522 \pm 0,826$	$2,359 \pm 1,162$	$2,832 \pm 0,495$	$2,895 \pm 0,650$
Период (сутки)	---	5,57	5,12	5,12
Амплитуда (усл.ед.)	---	$0,061 \pm 0,009$	$0,037 \pm 0,006$ $P_{2-3} < 0,05$	$0,032 \pm 0,004$ $P_{2-4} < 0,01$
Фаза (радианы)	---	$4,587 \pm 0,364$	$2,598 \pm 0,768$	$3,743 \pm 0,956$
Период (сутки)	6,40	---	7,11	---
Амплитуда (усл.ед.)	$0,049 \pm 0,006$	---	$0,041 \pm 0,006$	---
Фаза (радианы)	$2,306 \pm 0,201$	---	$2,315 \pm 0,639$	---
Период (сутки)	---	7,53	---	8,00
Амплитуда (усл.ед.)	---	$0,062 \pm 0,007$	---	$0,039 \pm 0,006$ $P_{2-4} < 0,05$
Фаза (радианы)	---	$2,798 \pm 0,547$	---	$3,049 \pm 0,676$
Период (сутки)	9,14	---	9,14	9,85
Амплитуда (усл.ед.)	$0,060 \pm 0,006$	---	$0,047 \pm 0,005$	$0,039 \pm 0,005$ $P_{1-4} < 0,01$
Фаза (радианы)	$2,523 \pm 0,234$	---	$2,376 \pm 0,848$	$3,049 \pm 0,676$

Примечание: P_{1-4} – различия достоверны между группами 1-4.

Обнаружено, что состав спектров ИР ноцицепции у моллюсков в различные сезоны неодинаков. Наиболее стабильными ритмами, выявляющимися в спектрах ИР параметров ноцицепции интактных моллюсков во все сезоны, являются ритмы с периодами $\approx 2,38$; $\approx 2,76$; $\approx 3,95$ суток. Весной в ИР выявлено шесть периодов: $\approx 2,46^d$; $\approx 2,67^d$; $\approx 3,37^d$; $\approx 3,76^d$; $\approx 6,40^d$ и $\approx 9,14^d$. Осенью и зимой обнаружено по семь периодов от $\approx 2,37^d$ до $\approx 9,85^d$. Наименьшее число выделяемых периодов отмечено летом (n=5): $\approx 2,33^d$; $\approx 2,61^d$; $\approx 3,88^d$; $\approx 5,57^d$; $\approx 7,53^d$.

Во все сезоны выявлена тенденция к увеличению амплитуд с увеличением длины периода. Максимальные значения амплитуд зарегистрированы летом, когда они колебались в пределах от 0,054 до 0,062 усл.ед., минимальные – зимой (0,023–0,039 усл.ед.). Следовательно, амплитуды ритмов летнего сезона превышали таковые зимнего сезона в 2 раза ($p<0,01$). Достоверных сдвигов фаз в выделяемых периодах обнаружено не было.

Изучение фазовых взаимоотношений изменений П и ЛП во всех выделенных периодах спектра ИР показал, что они различаются только на $1-2^\circ$, т.е. синхронизированы в высокой степени. Малые различия фаз выделенных инфрадианных ритмов было обнаружено для некоторых биохимических показателей лимфоцитов крови (активности сукцинат- и α -глицерофосфатдегидрогеназ) [11-13]. По-видимому, такое малое различие фаз сопряженных процессов является необходимым условием гомеостаза.

Таким образом, экспериментальные данные указывают на взаимосвязь сезонной и многодневной ритмики параметров ноцицепции у моллюсков.

Полученные в настоящем исследовании данные подтверждают сведения о том, что в пределах одной функциональной системы (в данном случае ноцицептивной) имеют место ритмы различных частотных диапазонов, которые имеют строгую иерархическую организацию.

Эти результаты значительно дополняют литературные сведения о временной организации физиологических систем моллюсков. В настоящее время у этих животных в деятельности различных систем обнаружены ритмы различной продолжительности: ультрадианные ритмы кардиоактивности и движения створок черноморской мидии *Mytilus galloprovincialis Lam.* с периодами 10, 25, 30 и 40 мин [14], циркадианная ритмика этих же показателей [15], ритмика локомоторной активности [16, 17], активности ноцицептивной системы [18]. Описаны и ритмы более продолжительные – приливно-отливные ритмы открытия раковины *Mytilus edulis* [19], лунные – в ориентационных эффектах животных [20], сезонная ритмика наземных моллюсков и даже 11-летний период в темпах роста раковин мидий Гряяна, связанный с солнечной активностью [21]. Наличие столь сложной временной организации является, по-видимому, одной из причин невоспроизводимости результатов исследования.

Таким образом, полученные нами данные о различиях динамики и временной организации параметров ноцицепции моллюсков от сезона года соответствуют представлениям о сезонной ритмике биологических систем и имеющимся литературным сведениям о зависимости процессов жизнедеятельности моллюсков от сезона года.

Установлено, что важную роль в регуляции сезонных ритмов играет мелатонин (МТ). МТ – эволюционно древняя молекула, обнаруженная не только у позвоночных и человека, но и у многих примитивных животных и растений, у которых он также играет важную роль в регуляции разнообразных процессов [22-25]. МТ содержится и у моллюсков. Так, у моллюсков *Aplysia californica* с помощью радиоиммунологических методов D. Abran et al. (1994) [22] идентифицировал МТ и серотонин в глазах и церебральных ганглиях. Эти данные были подтверждены в опытах с использованием флюориметрических методов. Высокий уровень МТ обнаружен в глазах в дневное время суток, а в церебральном ганглии – ночью. В педальных ганглиях МТ присутствует в очень малых количествах в полдень и в середине ночи. Обнаружен циркадианный ритм синтеза МТ, однако он несколько отличается от такового позвоночных животных. Описано распределение и закономерности секреции МТ и у другого моллюска – *Helix aspersa maxima* [26].

Установлено, что интенсивность биосинтеза МТ пропорциональна длине темновой фазы, поэтому он имеет ярко выраженную сезонную ритмику, что дает основание рассматривать этот ритм как календарь [27, 28]. Обнаружены и другие ритмы синтеза МТ [29]. Ритмы синтеза МТ, связанные с ритмикой факторов внешней среды, обуславливают формирование временной организации биологических систем различной степени сложности, в том числе и примитивных животных – моллюсков.

Таким образом, можно утверждать, что выявленные нами сезонные различия динамики и ИР ноцицепции интактных моллюсков обусловлены сезонной ритмикой синтеза МТ.

ВЫВОДЫ

1. Выявлена сезонная и многодневная ритмика ноцицепции интактных моллюсков.
2. Наиболее высокая устойчивость к термическому стимулу выявлена летом, наименее – весной, когда параметры ноцицепции были на 2-9% меньше, чем летом. Осенью и зимой отмечены более низкие значения изучаемых показателей, чем в летний сезон, но более высокие, чем весной.
3. Обнаружена взаимосвязь между сезонной и инфрадианной ритмикой, проявляющаяся в различиях составов спектров многодневной ритмики, а также амплитуд выделенных ритмов в различные сезоны. Во все сезоны выявляются периоды $\approx 2,38^d$; $\approx 2,76^d$; $\approx 3,95^d$. Максимальные значения амплитуд зарегистрированы летом (0,054-0,062 усл.ед.), минимальные – зимой (0,023-0,039 усл.ед.).

Список литературы

1. Malling-Hansen R. Perioden in Gewichte der Kinder und in der Sonnenwerme / R. Malling-Hansen // Kopenhagen. – 1886.
2. Lindhard J. Contribution to the physiology of respiration under arctic climate / J. Lindhard // Meddelser om Gronland. – 1917. – Vol. 44. – P. 77–175.

СЕЗОННАЯ И ИНФРАДИАННАЯ РИТМИКА НОЦИЦЕПЦИИ..

3. Hildebrandt G. Biologische Rhythmen und ihre bedeutung fur die Baderund Klimaheilkunde. / G. Hildebrandt // Handburh der Bader-und Klimaheilkunde - A. Amelung, A. Evers Struttgard.: Schattauer Verlag, 1962. – Р. 730–785.
4. Голиков А.П. Сезонные ритмы в физиологии и патологии / Голиков А.П. – М. : Медицина, 1973. – 156 с.
5. Мартынюк В.С. Связь динамики электрических характеристик организма человека с вариациями космической погоды / В.С. Мартынюк // Геофизические процессы и биосфера. – 2005. – Т.4, №1. – С. 53–61.
6. Вишневский В.Г. Установка для определения параметров болевой чувствительности наземных моллюсков / В.Г. Вишневский, А.С. Костюк, Н.А. Темурьянц // Физика живого. – 2009. – Т. 17(2). – С. 174–178.
7. Патент 48094 Україна, МПК51 А 01 К 61/00. Пристрій реєстрації параметрів бульової чутливості наземних молюсків / 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.
8. Емельянов И.П. Формы колебания в биоритмологии / Емельянов И.П. – Новосибирск : Наука, 1976. – 127 с.
9. Лапач С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. – К. : Модмон, 2000. – 319 с.
10. Боровиков В. Statistica. Искусство анализа данных на компьютере: Для профессионалов. 2–е изд. / Боровиков В. – СПб. : Питер, 2003. – 688 с.
11. Московчук О.Б. Вплив низькоінтенсивного електромагнітного випромінювання надвичайно високої частоти на інфрадіанну ритміку фізіологічних процесів : автореф. дис. на здобуття наук. Ступеня канд. біол. наук : спец. 03.00.13 «Фізіологія людини та тварин» / О.Б. Московчук – Сімферополь, 2003. – 20 с.
12. Шехоткин А.В. Влияние переменного магнитного поля сверхнизкой частоты на инфрадианную ритмiku количественных и функциональных характеристик лейкоцитов крови у интактных и эпифизэктомированных крыс: автореф. канд. биол. наук.: 03.00.13 – физиология человека и животных / А.В. Шехоткин. – 1995. – 25 с.
13. Chronobiological analysis of peripheral lymphocyte dehydrogenase activities in rats with Walker 256 carcinosarcoma (English) / L. Strigun, E. Chirkova, G. Grigoreva [et al.] // Anti–Cancer Drugs. – 1991. – Vol. 2. – Р. 305–310.
14. Ультрадианные ритмы кардиоактивности и движения створок черноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. / С.В. Холодкевич, Т.В. Кузнецова, А.В. Иванов [и др.] // Доповіді Національної академії наук України. – 2009. – № 8. – С. 163–167.
15. Циркадный ритм в движении створок и кардиоактивности двустворчатых моллюсков – существенные характеристики при оценке функционального состояния организмов / Т.В. Кузнецова, В.В. Трусевич, А.С. Куракин [и др.] // Всероссийская конференция с международным участием, посвященная 85-летию со дня основания Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, 7–9 декабря, 2010 г.: сборник докл. – Санкт-Петербург–Колтуши, 2010. – С. 156.
16. Circadian oscillators and photoreceptors in the gastropod, *Aplysia* / M.E. Lickey, G.D. Block, D.J. Hudson [et al.] // Photochemistry and Photobiology. – 1976. – Vol. 23. – Р. 253–273.
17. Zann L.P. Relationships between intertidal zonation and circatidal rhythmicity in littoral gastropods / L.P. Zann // Marine Biology. – 1973. – Vol. 18. – Р. 243–250.
18. Kavaliers M. Day-night rhythms of opioid and non-opioid stress-induced analgesia: differential inhibitory effects of exposure to magnetic fields / M. Kavaliers, K.P. Ossenkopp // Pain. – 1988. – Vol. 32. – Р. 223–229.
19. Rao K.P. Tidal rhythmicity of rate of water propulsion in *Mytilus* and its modifiability by transplantation / K.P. Rao // Biological Bulletin. – 1954. – Vol. 106. – Р. 353–359.
20. Brown F.A. A «compass – direction effect» for snails in constant conditions, and its lunar modulation / F. Brown, N.M. Webb // Biol. Bull. – 1960. – Vol. 119. – Р. 307.
21. Золотарев В.Н. Многолетние ритмы роста раковин мидии Граяна / В.Н. Золотарев // Экология. – 1974. – № 3. – С. 76–80.

22. Abran D. Melatonin Activity Rhythms in Eyes and Cerebral Ganglia of *Aplysia californica* / D. Abran, M. Anctil, A. Ali // Gen. & Comp. Endocrinol. – 1994. – Vol. 96, №2. – P. 215–222.
23. Hardeland R. Melatonin and 5-methoxytryptamine in non-metazoans / R. Hardeland // Reprod. Nutr. Dev. – 1999. – V. 39. – P. 399–408.
24. Hardeland R. The circadian rhythm of aryl acylamidase in *Gonyaulax polyedra*: Persistence in constant darkness / R. Hardeland, E. Cuivillier, D. Göttingen // Bio. Rhythms and Antioxidative Protection. – 1997. – P. 103–106.
25. Vivien-Roels Melatonin: presence and formation in invertebrates / Vivien-Roels, P. Pever // Birkhauser VerlagBales. – 1993. – P. 642
26. Melatonin 5– methoxytryptophol (5-ML) in nervousand / or neurosensory structures of a gastropod mollusc (*Helix aspersa maxima*): synthesisand diurnal rhythms / A. Blanc, B.V. Roels, P. Pevet [et al.] // Generaland comparative endocrinology. – 2003. – Vol. 131, Is.2. – P. 168–175.
27. Ашофф Ю. Биологические ритмы / Ашофф Ю. – М. : Мир, 1984. – Т. 1. – 176 с.
28. Деряпа Г.П. Проблемы медицинской биоритмологии / Г.П. Деряпа, М.П. Мошкин, В.С. Пояній – М. : Медицина, 1985. – 208 с.
29. Губин Г.Д. Хронобиологические проблемы профилактического медицины в организации РТО при экспедиционно–вахтовой форме труда и профессионального отбора / Г.Д. Губин, А.М. Дуров, В.В. Колпаков // Авиакосмическая и экологическая медицина. – 1988. – Т. 31, № 4. – С. 137–138.

Костюк О.С. Сезонна та інфрадіанна ритміка ноціепції інтактних молюсків *Helix albescens* / О.С. Костюк // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2012. – Т. 25 (64), № 3. – С. 81-88.

Найбільш високі значення параметрів ноціепції у інтактних молюсків зареєстровані влітку, найменші – у весняний період. Восени і взимку зареєстровані більш низькі значення досліджуваних параметрів, ніж у літній сезон, але трохи більш високі, ніж навесні. Багатоденна ритміка показників ноціепції включає ритми тривалістю від $\approx 2,38^d$ до $\approx 9,50^d$ доби. Виявлен взаємозв'язок між сезонною та багатоденною ритмікою, що виявляється у відмінностях складів спектрів інфрадіанної ритміки, а також амплітуд виділених ритмів. Найменше число виявлених періодів відзначено влітку (n=5), коли зареєстровані максимальні значення амплітуд.

Ключові слова: ноціепція, інфрадіанна ритміка, молюски, сезон року.

Kostyuk A.S. Seasonal and infradian rhythmicity nociception of intact snails *Helix albescens* / A.S. Kostyuk // Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No 3. – P. 81-88.

Seasonal and infradian rhythmicity of nociceptive sensitivity snails *Helix albescens* was detected. The highest values of nociception in intact snails were recorded in the summer, and the lowest – in the spring. In autumn and winter lower values of the studied parameters were recorded than in the summer, but a few more resistant than in spring. Multi-day rhythmicity indicators of nociception is included rhythms of between $\approx 2,38^d$ – $\approx 9,50^d$. An interconnection between seasonal and multi-day rhythmicities was manifested in the difference in the composition of the spectra of infradian rhythmicity and amplitude of rhythms. The smallest number of allocated periods was noted in the summer (n=5), when were registered maximum amplitudes.

Keywords: nociception, infradian rhythmicity, snails, season of the year.

Поступила в редакцию 15.09.2012 г.

Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского
Серия «Биология, химия». Том 25 (64). 2012. № 3. С. 89-94.

УДК 579.64:632.937.3

**ВЫДЕЛЕНИЕ И БИОТЕСТИРОВАНИЕ АКТИВНЫХ ШТАММОВ
ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ *BACILLUS THURINGIENSIS* BERLINER
ИЗ НАСЕКОМЫХ ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ КРЫМА**

Кузнецова Л.Н.

*Институт сельского хозяйства Крыма НААН, пгт. Гвардейское, Украина
E-mail: solanum@ukr.net*

Из насекомых крымских популяций выделен ряд штаммов *B. thuringiensis*, среди которых наибольшую энтомоцидную активность проявил штамм *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* 0371, изолированный из гусениц американской белой бабочки. При обработке листьев картофеля бактериальной культурой в течение 5 суток наступает 100% гибель личинок колорадского жука. Штамм является технологичным и может быть основой для биопрепаратов, используемых для защиты сельскохозяйственных растений от листогрызущих вредителей.

Ключевые слова: *Bacillus thuringiensis*, штамм, энтомопатоген, эффективность.

ВВЕДЕНИЕ

Стремление к сохранению биосфера от загрязнения обуславливает интерес к поиску нехимических средств защиты растений от вредных насекомых. Большинство биопрепаратов, выпускаемых сегодня в мире, изготавливаются на основе энтомопатогенных штаммов *B. thuringiensis*. Вирулентность этого возбудителя — одно из решающих условий эффективности, а значит и перспективности использования данных бактерий в защите растений [1]. *B. thuringiensis* является естественным обитателем биоценозов. Однако большая численность насекомых, их естественная устойчивость к инфекции, сложные биоценотические связи, влияние абиотических факторов способствуют образованию новых активных форм микроорганизмов [2]. Поэтому поиск высокоактивных и технологичных для производства биопрепаратов штаммов *B. thuringiensis* всегда является актуальным.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили в отделе микробиологии Института сельского хозяйства Крыма НААН. Энтомопатогенные бактерии выделяли из насекомых, собранных в природных популяциях по методике Л.И. Бурцевой [3]. Способность выделенных бактерий к образованию спор и белковых кристаллов эндотоксина определяли микроскопированием [4].

Идентификацию выделенных штаммов проводили согласно схемы идентификации А. Barjac, А. Bonnefoi и А. Lysenko [5, 6]. В качестве эталонных

были взяты штаммы следующих серотипов: *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* 994, *B. thuringiensis* var. *kurstaki* 0293, *B. thuringiensis* var. *dendrolimus* 942, *B. thuringiensis* var. *morrisoni* 109-С и *B. thuringiensis* var. *darmstadiens* 820.

Энтомоцидное действие новых штаммов изучали в лабораторных условиях по методике А.Я. Лесковой [4]. Биотест – личинки колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata*, *Coleoptera*) младшего возраста. Опыты проводили в 3-х повторностях в стеклянных сосудах, куда помещали насекомых и, обработанные жидкими культурами штаммов, листья картофеля. Обработанным кормом личинки питались 3 суток, после чего корм меняли на необработанный. В качестве эталона использовали жидкую споровую культуру производственного штамма *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* 994.

Жидкие споровые культуры получали при культивировании бактерий в питательной среде на технологических качалках (220 об. / мин.) в течение 48 часов при температуре 28-30⁰С [7].

Технологичность штаммов определяли по методике С.Д. Перта [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований в природных популяциях Крыма собрано 68 погибших и больных насекомых - представителей отрядов *Coleoptera*, *Lepidoptera*, *Diptera*. Микробиологическим анализом собранного материала выделено 28 штаммов микроорганизмов, 4 из которых по первоначальным признакам споро- и кристаллообразования отнесены к бактериям группы *B. thuringiensis* (табл.1).

Таблица 1
Характеристика штаммов *B. thuringiensis*, выделенных из насекомых
природных популяций Крыма

Штамм	Стация сбора	Объект сбора	Состояние насекомого
0363	приусадебный участок, капуста	капустная совка (<i>Mamestra brassicae</i> L.)	труп имаго
0371	лесополоса, клен	американская белая бабочка (<i>Hyphantria cunea</i> Drury)	трупы гусениц младших возрастов
0379	поле, картофель	колорадский жук (<i>Leptinotarsa decemlineata</i> Say)	трупы и инфицированные гусеницы старших возрастов
0411	лесополоса, абрикос	кольчатый шелкопряд (<i>Malacosoma neustria</i> L.)	трупы личинок старших возрастов

Для идентификации новых выделенных штаммов изучали их морфологические и физиолого-биохимические свойства, а также способность к продуцированию термостабильного экзотоксина.

ВЫДЕЛЕНИЕ И БИОТЕСТИРОВАНИЕ АКТИВНЫХ ШТАММОВ...

Морфологию колоний и клеток наблюдали при выращивании бактерий на мясопептонном агаре (МПА). Культуры определены как быстрорастущие. Колонии на поверхности среды появлялись на вторые-трети сутки, имели круглую или неправильную форму с зубчатой границей, вязкие по консистенции, диаметром в среднем 5-12 мм. Рельеф колоний плоский, поверхность матовая, серовато-кофейного цвета с более светлой ареолой.

Бактериальные клетки – грамположительные палочки размером 0,3-1,2 мкм, подвижные, благодаря наличию жгутиков (перитрихи). На стадии вегетативного роста образуют цепочки (от 6 - 8 до 10 - 12 клеток в цепочке в зависимости от штамма). Споры и кристаллы в клетках расположены субтерминально.

На твердых и жидких средах штаммы выделенных *B. thuringiensis* растут в пределах 20-45 °C, температурный оптимум 26-30 °C. Рост бактерий наблюдали в диапазоне pH 6,0-8,6, а оптимальной является реакция среды 6,9-7,2.

При культивировании исследуемых штаммов на диагностических средах показано, что в процессе роста бактерии способны образовывать ацетил-метил-карбинол (АМК) на средах, с пептоном и глюкозой и лецитиназу, на средах, содержащих лецитин (табл. 2).

Таблица 2
Физиолого-биохимические свойства штаммов *Bacillus thuringiensis*,
выделенных из насекомых природных популяций Крыма

Штамм <i>B. thuringiensis</i>	Образование					Гидролиз		Усвоение			
	АМК	Лецитиназы	Уреазы	Вуали	Пигмента	Крахмала	Желатины	Сахарозы	Маннозы	Глюкозы	Лактозы
994 (var. <i>thuringiensis</i>)	+	+	-	+++	-	++	++	+	+	+	-
0293 (var. <i>kurstaki</i>)	+	+	++	-	-	++	++	-	-	+	-
942 (var. <i>dendrolimus</i>)	+	+	-	-	-	+	+++	-	-	+	-
109-C (var. <i>morrisoni</i>)	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-
820 (var. <i>darmstadiens</i>)	+	-	-	-	-	++	+++	-	-	+	-
0363	+	+	-	+++	-	++	+++	+	+	+	-
0371	+	+	-	++	-	++	+++	+	+	+	-
0379	+	+	-	+++	-	+	++	+	+	+	-
0411	+	+	-	+++	-	++	+	+	+	+	-

Примечание. Условные обозначения: Образование АМК, лецитиназы; образование уреазы, вуали, пигмента; усвоение сахаров: + реакция положительная, - реакция отрицательная. Гидролиз крахмала: - гидролиз отсутствует, + зона гидролиза 2-3 мм, ++ зона гидролиза 5-6 мм. Протеолиз желатина: + растворения 1/3 колонки, ++ растворения 2/3 столбика и +++ полное растворение, - реакция отрицательная.

Бактерии проявляют способность к гидролитическому расщеплению крахмала. Зона гидролиза составляет от 2,2 до 3,8 мм. В качестве источника углерода усваивают сахарозу, глюкозу и маннозу, обладают протеолитической активностью, которая проявляется в разрежении желатины. Бактерии не образуют уреазы и пигментов. На мясопептонном бульоне образуют вуаль.

Биотест *Musca domestica* L. выявил способность новых штаммов к продуцированию экзотоксина.

По исследованным морфологическим и физиолого-биохимическим характеристикам выделенные штаммы 0361, 0371, 0379 и 0411, согласно схемы идентификации A. Barjac, A. Bonnefoi и A. Lysenko, отнесены к бактериям группы *B. thuringiensis* var. *thuringiensis*.

Биотестирование идентифицированных штаммов *B. thuringiensis* на личинках колорадского жука показало, что наиболее высокими энтомопатогенными свойствами характеризуются штаммы 0371 и 0411. Гибель насекомых в опытах с кормом, обработанным жидкими споровыми культурами таких штаммов, превышала гибель насекомых в опытах с кормом, обработанным культурой эталонного штамма 994, как по количеству погибших насекомых, так и по времени (табл. 3).

Таблица 3
Энтомоцидная активность штаммов *B. thuringiensis*, выделенных из природных популяций Крыма, против личинок колорадского жука (L_{1-2})

Штамм <i>B. thuringiensis</i>	Гибель личинок на сутки, %			
	3	5	7	10
Контроль (вода)	1,7±0,01	6,7±0,2	8,3±1,6	8,3±1,6
994 (эталон)	5,0±0,2	81,7±1,6	91,7±4,4	98,3±1,6
0363	41,7±1,4	70,0±1,6	95,0±3,2	95,0±3,2
0371	31,7±0,6	100		
0379	8,0±0,3	48,0±0,7	65,3±0,3	76,0±0,1
0411	44,0±0,2	96,7±3,2	100	

Под влиянием штамма 0371 полную гибель личинок наблюдали на 5-ые суток, под влиянием штамма 0411 – на 7-е сутки. В варианте же с эталонным штаммом 994 за аналогичный период погибало соответственно 81,7% и 91,7% насекомых, причем, 100%-ная гибель личинок под действием штамма 994 не была отмечена и на 10-е сутки опыта.

Как менее активные энтомопатогены определены штаммы 0363 и 0379, под действием которых процент погибших насекомых не превышал соответственно 95,0% и 76,0% на 10-е сутки.

Выделенный новый штамм *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* 0371, обладающий высоким энтомопатогенным действием против личинок колорадского жука, был исследован на технологичность. Культивирование бактерий проводили в дрожжеполисахаридной питательной среде в качалочных колбах с объёмом среды 50 мл.

Показано, что для бактерий на стадии вегетативных клеток характерна динамика роста и развития, которая состоит из 4-х классических фаз: Lag-фазы, фазы ускорения роста, экспоненциальной и стационарной фаз. Lag-фаза проходила в течение 0,5-1,5 часов, а последующие фазы развития вегетативных клеток - до 10-14 часов. Титр жидких культур за этот период достигал 0,5-0,8 млрд. колониеобразующих единиц в 1 мл. Через 12-16 часов культивирования в вегетативных клетках отмечали начало активного формирования белковых кристаллов и спорогенных зон. Массовую споруляцию наблюдали через 20-24 часа. Весь период культивирования составлял 45-48 часов и заканчивался полным освобождением спор из спорангииев (табл. 4).

Таблица 4
Технологические показатели развития бактерий штамма *B. thuringiensis* 0371 при культивировании в дрожжеполисахаридной среде

Этап развития бактерий	Период наблюдения (часов)
Начало образования спорогенных зон	14-16
Массовая споруляция	20-24
10% свободных спор	28-30
Споры и кристаллы в свободном состоянии	45-48

Технологические показатели развития бактерий, представленные в таблице 4, характеризуют штамм 0371 как технологичный [9].

ВЫВОД

Таким образом, полученные в ходе исследований данные свидетельствуют, что штамм *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* 0371, выделенный из гусениц американской белой бабочки крымской популяции, обладает высоким энтомопатогенным действием против личинок колорадского жука, является технологичным, и, следовательно, может быть основой для разработки нового биопрепарата для защиты сельскохозяйственных растений от листогрызущих вредителей.

Список литературы

1. Лескова А.Я. Энтомопатогенные бактерии и их роль в защите растений / А.Я. Лескова, Л.М. Рыбина – Новосибирск, 1987. – С.31–42.
2. Kalmakoff J. Ecological approaches to the use of microbial pathogens in Bact. control. / J. Kalmakoff, J. Miles // Bio. Bciehce – 1980. – V.30. – №5. – p.334–347.
3. Бурцева Л. И. Методы выделения и биотестирования энтомопатогенных бактерий. // Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты. [под ред. В.В. Глупова.] / Л. И. Бурцева М. : Круглый год, 2001. – 736 с.

4. Лескова А.Я. Идентификация культур *Bacillus thuringiensis* и оценка их патогенных свойств (Методические указания) / Лескова А. Я. – Л. : – 1984. – С. 17–19.
5. Lysenko O. The taxonomy of entomogenous bacteria / O. Lysenko – Insect. Pathology. – New York, acad. Pres.– 1963. – V. 2. (Ed. Steinhouse) – P. 638–661.
6. Barjac de H. Classification of strains of *Bacillus thuringiensis* a Kuj to their differentiation / H. de Barjac, A. Bonnefond // J. Insect. Pathol. – 1963. – №. 11. – P. 333.
7. Евлахова А.А. Болезни вредных насекомых. Методы учета, сбора, хранения насекомых, пораженных болезнями. // Евлахова А.А., Швецова О.И. – М., 1965. – С. 51.
8. Перт С.Д. Основи культивування мікроорганізмов і клеток/ Перт С.Д. – М: Мир, 1978. – 332 с.
9. Яворська Г.В. Промислова Мікробіологія / Яворська Г.В., Гудзь С.П., Гнатуш С.О. – Львів, 2008. – 256 с.

Кузнецова Л.М. Виділення та біотестування активних штамів ентомопатогенічних бактерій *Bacillus thuringiensis* Berliner з комах природних популяцій Криму/ Л.М. Кузнецова // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2012. – Т. 25 (64), № 3. – С. 89-94.

З комах кримських популяцій виділено ряд штамів *B. thuringiensis*, серед яких найбільшу ентомоцидну активність виявив штам *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* 0371, ізольований з гусениць американського білого метелика. За обробки листя картоплі бактеріальною культурою протягом 5 діб настає 100% загибель личинок колорадського жука. Штам є технологічним і може бути основою для біопрепаратів, що використовуються для захисту сільськогосподарських рослин від листогризучих шкідників.

Ключові слова: *Bacillus thuringiensis*, штам, ентомопатоген, ефективність.

Kusnezova L.N. The influence of *Bacillus thuringiensis* on the quantity of the phylloplana epiphytic microflora and its fungustatic action against the activators of illnesses in the potato agroecosystem / L.N. Kusnezova // Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No 3. – P. 89-94.

The several strains of *B. thuringiensis* were selected from the crimean insect populations. The strain *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* 0371, isolated from *Hyphantria cunea* Drury caterpillars showed the most insecticidal activity. While processing the potato leaves with bacterial culture we observed the 100% mortality of potato beetle larvae for 5 days. The strain is a technological one and it can be the base for biopreparation for plant protection against leaf-cutting predators.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, strain, entomopathogens, efficiency.

Поступила в редакцію 19.09.2012 г.

УДК 616.39-053.6+612.349.8:661.727

**АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ УТИЛИЗАЦИИ ЭНДОГЕННЫХ АЛЬДЕГИДОВ
В КРОВИ ПОДРОСТКОВ С ОЖИРЕНИЕМ, ОСЛОЖНЕННЫМ
ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТЬЮ**

Кулешова Д.К., Давыдов В.В.

ГУ «Институт охраны здоровья детей и подростков НАМН Украины», Харьков, Украина
E-mail: darya.kuleshova@gmail.com

Для выяснения особенностей формирования нейроэндокринного ожирения в пубертатном возрасте в работе было проведено исследование активности отдельных ферментов катаболизма эндогенных альдегидов в крови подростков с нейроэндокринным ожирением, осложненным инсулинерезистентностью и без нее. Показано, что при неосложненном инсулинерезистентностью нейроэндокринном ожирении у подростков раннего и позднего пубертатного возраста не происходит изменения базальной мощности ферментативной системы катаболизма эндогенных альдегидов в крови. У подростков с нейроэндокринным ожирением, сопровождающимся инсулинерезистентностью, в большей мере в позднем пубертатном возрасте, возникает адаптивное повышение активности ферментов катаболизма эндогенных альдегидов. Следствием его возникновение становится уменьшение содержания карбонильных продуктов свободнорадикального окисления в крови у подростков 16-18 лет с ожирением, осложненным инсулинерезистентностью.

Ключевые слова: подростки, пубертат, ожирение, инсулинерезистентность, альдегидредуктаза, глутатионтрансфераза, карбонилированные белки.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы в Украине растет заболеваемость нейроэндокринным ожирением среди подростков [1, 2], что формирует негативные тенденции к повышению заболеваемости сердечно-сосудистой патологией в зрелом возрасте. Все это диктует необходимость разработки новых эффективных подходов к лечению и профилактике данной патологии на этапе полового созревания, чего можно достичь лишь при условии детального выяснения молекулярных механизмов ее развития.

Многочисленные литературные данные свидетельствуют о том, что развитие нейроэндокринного ожирения у взрослых пациентов сопровождается формированием оксидативного стресса [3-5]. Следствием возникновения этого состояния становится накопление в организме цитотоксических карбонильных продуктов свободнорадикального окисления, к числу которых относятся эндогенные альдегиды [6, 7]. Последние выступают в качестве своеобразных медиаторов повреждения [6, 8], предопределяющих формирование характерных

сдвигов со стороны обмена веществ при ожирении. Важную роль в адаптации к повреждающему действию оксидативного стресса играет ферментативная система утилизации эндогенных альдегидов [6, 7]. Она включает в себя многочисленные энзимы, которые катализируют окислительно-восстановительные превращения альдегидов, а также их коньюгацию с глутатионом [8, 9]. Однако до настоящего времени в литературе все еще отсутствуют сведения об активности этих ферментов у больных с ожирением. Отсутствуют также и данные о состоянии ферментативной системы утилизации эндогенных альдегидов при ожирении на фоне инсулинерезистентности, как одного из наиболее часто встречающихся осложнений этого заболевания у подростков [10].

Учитывая вышеизложенное, целью работы явилось изучение активности отдельных ферментов катаболизма эндогенных альдегидов в крови подростков с нейроэндокринным ожирением, осложненным инсулинерезистентностью и без нее.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования выполнены у 80 мальчиков-подростков раннего (13–15 лет) и позднего (16–18 лет) пубертатного возраста. Каждая возрастная группа обследованных, в свою очередь, делилась на 3 подгруппы: 1 – здоровые (без соматической патологии, с нормальной массой тела), 2 – подростки с нейроэндокринным ожирением без инсулинерезистентности и 3 – подростки с нейроэндокринным ожирением, осложненным инсулинерезистентностью. Обследуемые 2 и 3 групп имели I и II степень ожирения.

Инсулинерезистентность выявляли путем оценки величины индекса НОМА [11]. Содержание инсулина в крови измеряли радиоиммunoлогическим методом с помощью наборов Insulin(e) IRMAKIT, Beckman Coulter, Чехия. Концентрацию глюкозы в крови определяли глюкозооксидазным методом с использованием наборов Glucocapil и прибора Super GL, Германия.

В гемолизате и сыворотке крови обследуемых подростков измеряли активность альдегидредуктазы [К.Ф. 1.1.1.21] и глутатионтрансферазы [К.Ф. 2.5.1.18].

Определение активности альдегидредуктазы проводили по методу [12]. Для этой цели 0,1 мл сыворотки крови или 0,1 мл гемолизата эритроцитов вносили в спектрофотометрическую кювету, содержащую (конечная концентрация) 0,05 М калий-фосфатного буфера (рН 6,5), 0,01 М глутарового альдегида и 0,0001 М восстановленного NAD. Скорость реакции измеряли по уменьшению оптической плотности реакционной смеси при 340 нм.

Определение активности глутатионтрансферазы проводили по методу [13]. Для этого 0,1 мл сыворотки крови вносили в спектрофотометрическую кювету, содержащую (конечная концентрация) 0,1 М калий-фосфатного буфера (рН 6,5), 0,001 М динитрохлорбензола и 0,005 М восстановленного глутатиона. Скорость реакции измеряли по изменению оптической плотности реакционной смеси при 340 нм.

Помимо измерения активности ферментов, в сыворотке крови исследовали также содержание карбонилированных белков по реакции с 2,4-

динитрофенилгидразином [14] и концентрацию веществ, дающих положительную реакцию с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК-реактивных веществ) [15].

Полученные данные подвергали статистической обработке с использованием непараметрического метода Wilcoxon-Mann-Whitney.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенных исследований представлены в Таблицах 1 и 2.

Таблица 1

Активность ферментов катаболизма эндогенных альдегидов в крови подростков раннего пубертатного возраста (13-15 лет) с ожирением, осложненным инсулиновезистентностью и без нее (Ме±Se; n)

Фермент		1 группа	2 группа	3 группа
Альдегидредуктаза, мкмоль/мл·мин	сыворотка	0,008±0,002 7	0,008±0,003 10	0,01±0,004 8
	гемолизат	0,003±0,001 6	0,005±0,004 11	0,005±0,003 9
Глутатионтрансфераза, нмоль/мл·мин		36,8±6,8 5	34,2±8,3 10	63±21* 9**

Примечания: * - достоверность различий показателей по сравнению с 1 группой ($p<0,05$);

** - достоверность различий показателей по сравнению со 2 группой ($p<0,05$).

Таблица 2

Активность ферментов катаболизма эндогенных альдегидов в крови подростков позднего пубертатного возраста (16-18 лет) с ожирением, осложненным инсулиновезистентностью и без нее (Ме±Se ;n)

Фермент		1 группа	2 группа	3 группа
Альдегидредуктаза, мкмоль/мл·мин	сыворотка	0,008±0,003 8	0,003±0,002* 9	0,005±0,004 11
	гемолизат	0,004±0,002 7	0,005±0,006 9	0,035±0,03* 9**
Глутатионтрансфераза, нмоль/мл·мин		42,2±5,5 7	55,7±19,7 13***	63,1±16* 12

Примечания: * - достоверность различий показателей по сравнению с 1 группой ($p<0,05$);

** - достоверность различий показателей по сравнению со 2 группой ($p<0,05$);

*** - достоверность различий показателей по сравнению со 2 группой раннего пубертатного возраста ($p<0,05$).

Из них следует, что активность глутатионтрансферазы и альдегидредуктазы в крови подростков, находящихся на разных стадиях полового созревания, находится на одинаковом уровне.

У подростков раннего пубертатного возраста с нейроэндокринным ожирением активность глутатионтрансферазы и альдегидредуктазы соответствует таковой у

здоровых сверстников. В то же время у подростков позднего пубертатного возраста при ожирении происходит уменьшение в 2,7 раза активности альдегидредуктазы в сыворотке крови, хотя в гемолизате ее величина остается на исходном уровне. При этом активность глутатионтрансферазы у них оказывается на 63 % выше, чем у подростков раннего пубертатного возраста с ожирением.

При ожирении, осложненном инсулинерезистентностью, у подростков 13–15 лет выявляется увеличение активности глутатионтрансферазы на 85% по сравнению с неосложненной формой нейроэндокринного ожирения и на 70% по сравнению с таковой у здоровых подростков данной возрастной группы. У подростков 16–18 лет с ожирением, осложненным инсулинерезистентностью, имеет место резкое увеличение активности альдегидредуктазы в гемолизате по сравнению с ее величиной у подростков с неосложненной формой нейроэндокринного ожирения и здоровыми обследуемыми данной возрастной группы. Одновременно у них повышается активность глутатионтрансферазы на 13% по сравнению с таковой у здоровых подростков 16–18 лет.

Анализ полученных результатов не позволяет выявить существенных различий в базальной мощности ферментов катаболизма карбонильных продуктов свободнорадикального окисления, катализирующих утилизацию альдегидов в процессах, связанных с их восстановлением и конъюгацией, на разных этапах полового созревания. Однако в условиях нейроэндокринного ожирения активность этих энзимов в разной мере подвергается модуляции. Причиной этого могут быть возрастные различия изоферментного спектра альдегидредуктаз и глутатионтрансфераз крови и, как следствие того, неодинаковая устойчивость отдельных их представителей к регуляторным воздействиям в условиях нейроэндокринного ожирения. Вместе с тем высказанное предположение требует проведения специальных исследований, связанных с изучением изоферментного спектра крови на разных этапах полового созревания.

Сравнительная оценка результатов проведенных исследований свидетельствует об отсутствии существенных изменений со стороны активности альдегидредуктазы и глутатионтрансферазы в крови при неосложненной форме ожирения. При этом некоторое понижение альдегидредуктазной активности сыворотки крови у подростков позднего пубертатного возраста компенсируется ростом активности глутатионтрансферазы. Это позволяет думать о своеобразном переключении у них катаболизма эндогенных альдегидов с восстановительного пути на путь, сопряженный с конъюгацией карбонильных продуктов свободнорадикального окисления с глутатионом.

При ожирении, осложненном инсулинерезистентностью, возникает повышение активности глутатионтрансферазы в крови, а у подростков позднего пубертатного возраста при этом дополнительно повышается активность альдегидредуктазы в эритроцитах. Все это свидетельствует о том, что ожирение на фоне инсулинерезистентности сопровождается компенсаторным повышением мощности ферментативной системы катаболизма эндогенных альдегидов, в большей мере выраженное у подростков позднего пубертатного возраста. По всей вероятности возникающий сдвиг имеет характер адаптивной реакции, направленной на

ограничение уровня накопления цитотоксических карбонильных продуктов метаболизма и, как следствие того, повышение устойчивости организма к действию повреждающих факторов оксидативного стресса. Учитывая это, далее были проведены исследования, связанные с измерением концентрации ТБК-реактивных веществ и карбонилированных белков в крови. Последние в большинстве своем представляют собой аддукты белков с карбонильными продуктами (альдегидами) свободнорадикального окисления [16-18]. Полученные результаты представлены на рис. 1 и 2.

Из рис. 1 следует, что у подростков раннего пубертатного возраста с нейроэндокринным ожирением, осложненным инсулинорезистентностью, а также и без нее не происходит существенного изменения уровня карбонилированных белков в крови. В то же время у подростков позднего пубертатного возраста при ожирении имеет место двухкратное понижение концентрации карбонилированных белков в крови. В равной мере аналогичная ситуация характерна и для ожирения, осложненного инсулинорезистентностью. Возникновение подобных изменений приводит к тому, что содержание карбонилированных белков крови подростков 2 и 3 групп 16–18 лет с осложненным и неосложненным ожирением оказывается ниже такового у подростков 13–15 лет.

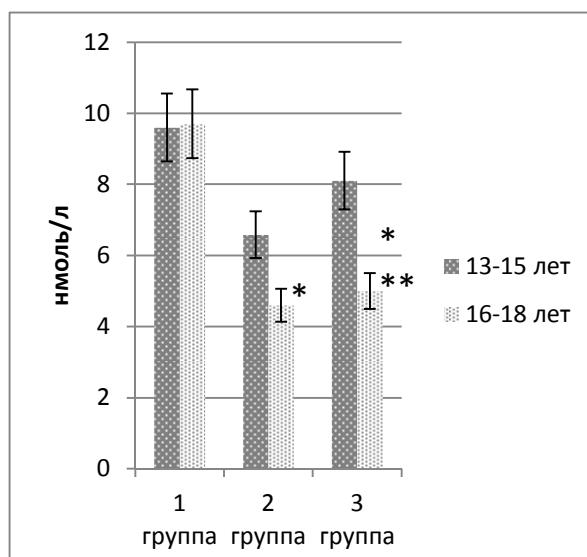


Рис. 1. Содержание карбонилированных белков в крови подростков с ожирением, осложненным инсулинорезистентностью и без нее.

Примечания: * - $P<0,05$ к 1 группе 16-18 лет;

** - $P<0,05$ к 3 группе 13-15 лет.

Сходная картина выявляется при анализе уровня ТБК-реактивных веществ в крови обследуемых подростков разных возрастных групп. Как следует из данных, представленных на рис. 2, при ожирении, сопровождающимся

инсулинерезистентностью и без него, у подростков позднего пубертатного возраста не происходит достоверного изменения концентрации ТБК-реактивных веществ в крови. В то же время у подростков раннего пубертатного возраста с осложненным инсулинерезистентностью нейроэндокринным ожирением и без него, концентрация ТБК-реактивных веществ в крови возрастает на 57% по сравнению с таковой у здоровых обследуемых данной возрастной группы.

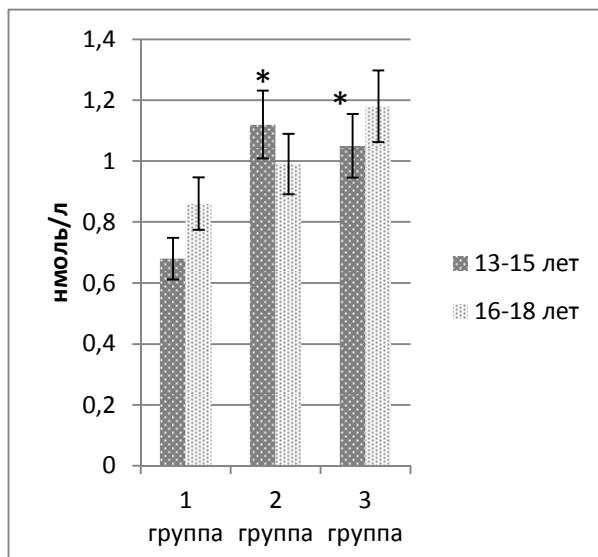


Рис. 2. Содержание ТБК-реактивных веществ в крови подростков с ожирением, осложненным инсулинерезистентностью и без нее.

Примечания: *- $P<0,05$ к 1 группе.

Полученные результаты могут служить косвенным подтверждением того, что повышение активности изученных ферментов катаболизма эндогенных альдегидов действительно способствует уменьшению уровня эндогенных альдегидов в организме и, тем самым, ограничению альтерирующих эффектов оксидативного стресса, сопровождающего нейроэндокринное ожирение. Вместе с тем причины формирования неодинаковой реакции со стороны ферментативной системы катаболизма эндогенных альдегидов в раннем и позднем пубертате остаются неясными. Возможно, они связаны с различиями в интенсивности возникающего в разном возрасте оксидативного стресса. Однако возможно и то, что они обусловлены возрастными различиями в изоферментном спектре изученных энзимов в крови. Выяснению этого вопроса будут посвящены наши дальнейшие исследования.

ВЫВОДЫ

1. Активность альдегидредуктазы и глутатионтрансферазы в крови подростков раннего и позднего пубертатного возраста находится на одинаковом уровне.

- При неосложненном инсулинерезистентностью нейроэндокринном ожирении у подростков раннего и позднего пубертатного возраста не происходит изменения базальной мощности ферментативной системы катаболизма эндогенных альдегидов в крови.
- У подростков с нейроэндокринным ожирением, сопровождающимся инсулинерезистентностью, в большей мере в позднем пубертатном возрасте, возникает адаптивное повышение активности ферментов катаболизма эндогенных альдегидов. Следствием его возникновения становится уменьшение содержания карбонильных продуктов свободнорадикального окисления в крови у подростков 16-18 лет с ожирением, осложненным инсулинерезистентностью.

Список литературы

- Аверьянов А.П. Ожирение детей и подростков: клинико-метаболические особенности, лечение, прогноз и профилактика осложнений / А.П. Аверьянов // Международный эндокринологический журнал. – 2009. – Т.22, №4. – С. 90–98.
- Blood pressure and obesity among adolescents: a school-based population study in China / C. Zhong-qiang, Z. Liping, Z. Tao [et al.] // American Journal of Hypertension. – 2012. – Vol. 255. – P. 576–582.
- Bondia-Pons I. Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity / I. Bondia-Pons, L. Ryan, J.A. Martinez// J. Physiol. Biochem. – 2012. – Vol. 68, № 1.–P. 130–139.
- Isuline sensitive and resistant obesity in humans: AMPK activity, oxidative stress, and depot specific changes in gene expression in adipose tissue / X.J. Xu, M.S. Gauthier,D.T. Hess [et al.] // J. Lipid. Res. – 2012. – Vol. 4. – P. 792–801.
- Cardiolipin remodeling by ALCAT1 links oxidative stress and mitochondrial dysfunction to obesity/ J. Li, C. Romestaing, X. Han [et al.] // Cell. Metab. – 2010. – Vol. 12, №2. – P.154–165.
- Uchida K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases/ K. Uchida // Free Radical. Biol. Med. – 2000. – Vol. 28, №. 12 – P. 1685–1696.
- Davydov V.V. Possible role of aldehyde's scavenger enzymes during aging / V.V. Davydov, N.M. Dobaeva, A.I. Bozhkov // Exp. Gerontol. – 2004. – Vol.39. – P. 11–16.
- Давидов В.В. Физиологическая и патофизиологическая роль эндогенных альдегидов./ Давидов В.В., Божков А.И., Кульчицкий О.К. – Saarbrucken: Palmarium Academic Publishing, 2012. – 240 с.
- Hayes J.D. Glutathione transferases/ J.D. Hayes, J.U. Flanagan, I.R. Jowsey // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. – 2005. – Vol. 45. – P. 51–88.
- Сенаторова А.С. Ремоделирование сердца как результирующая метаболических и гемодинамических влияний у подростков с избыточной массой тела и ожирением / А.С. Сенаторова, Т.В. Чайченко // Здоровье ребенка. – 2011. – Т. 31, №4. – С. 21–25.
- Діагностика інсулінерезистентності у дітей та підлітків з ожирінням / Будрейко О.А., Нікітіна Л.Д., Чумак С.О. [та інш.] // Методичні рекомендації. – К.: Нац. академія мед. наук України, МОЗ України, Укр. центр науков. мед. інформації та патентно-ліценційної роботи, 2011. – 24 с.
- Фомина Е.В. Альдегидредуктазная активность печени крыс разного возраста при иммобилизационном стрессе / Е.В. Фомина, В.В. Давыдов// Проблемы старения и долголетия. – 2004. – Т.13, № 4. – С. 510–517.
- Mannervik B .Glutathione transferase / B. Mannervik,C. Guthenberg // Methods in enzymology. – 1981. – Vol.77. – P.231–235.
- Дубинина Е.Е. Окислительная модификация белков плазмы крови больных с психиатрическими расстройствами / Е.Е. Дубинина // Вопр. мед. химии. –2000. – № 4. – С. 36–47.
- Esterbauer H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal / H. Esterbauer, K.H. Cheeseman // Methods in enzymology. – 1990. – Vol.186. – P.407–421.
- Suzuki J.Y. Protein Carbonylation / Y.J. Suzuki, M.Carini, D.A. Batterfield // Antioxidants & Redox Signaling. – 2010. – Vol.12, №12. – P. 323–325.
- Grimsrud P.A. Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes / P.A. Grimsrud, H. Xie, T.J. Griffin, D.A. Bernlohr / J. Biol. Chem. – 2008. – Vol.283. – P.21837–21841.

18. Protein adducts generated from products of lipid oxidation: focus on NHE and one / L.M. Sayre, D. Lin, Q. Yuan [et al.] // Drug Metab. Rev. – 2006. – Vol 38. – P. 651–675.

Кулєшова Д.К. Активність ферментів утилізації ендогенних альдегідів в крові підлітків з ожирінням, ускладненим інсульнорезистентністю / Д.К. Кулєшова, В.В. Давидов // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2012. – Т. 25 (64), № 3. – С. 95-102.

Для з'ясування особливостей формування нейроендокринного ожиріння у пубертратному віку в роботі було проведено дослідження активності окремих ферментів катаболізму ендогенних альдегідів в крові підлітків з нейроендокринним ожирінням, ускладненим інсульнорезистентністю і без неї. Показано, що при неускладненому інсульнорезистентністю ожирінні у підлітків раннього та пізнього пубертратного віку не відбувається змін базальної потужності ферментативної системи катаболізму ендогенних альдегідів в крові. У підлітків з нейроендокринним ожирінням, що супроводжується інсульнорезистентністю, в більшій мірі у пізньому пубертратному віку, виникає адаптивне підвищення активності ферментів катаболізму ендогенних альдегідів. Внаслідок його виникнення стає зменшення змісту карбонільних продуктів вільнопардикального окислення в крові у підлітків 16-18 років з ожирінням, ускладненим інсульнорезистентністю.

Ключові слова: підлітки, пубертрат, ожиріння, інсульнорезистентність, альдегідреуктаза, глутатіонтрансфераза, карбоніліровані білки.

Kulieshova D.K. The activity of blood enzymes of endogenous aldehydes utilization in adolescents with a complicated insulin resistance obesity / D.K. Kulieshova, V.V. Davyдов // Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No 3. – P. 95-102. The present study was performed to elucidate the features of neuroendocrine obesity formation in puberty. The activity of some enzymes of endogenous aldehydes catabolism has been investigated in the blood of adolescents with neuroendocrine obesity, complicated with insulin resistance, or without such a complication. In adolescents with neuroendocrine obesity but without insulin resistance complication in early or late puberty there were observed no blood changes as regards basal power of the enzymatic system of the endogenous aldehydes catabolism. However, in adolescents with a complicated insulin resistance neuroendocrine obesity an adaptive increase in the enzymatic activity of the endogenous aldehydes catabolism was revealed mostly in late puberty. The consequence of such an increase is a decreased blood content of carbonylated products of free radical oxidation in adolescents, aged 16-18, with a complicated insulin resistance obesity.

Keywords: adolescents, puberty, obesity, insulin resistance, aldehyde reductase, glutathione transferase, carbonyl proteins.

Поступила в редакцію 29.09.2012 г.

УДК: 616-001.4-089-032:611-013.395

ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ ТРАНСАМИНАЗ И СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКА ПРИ АЛЛОТРАНСПЛАНТАЦИИ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ И СФОРМИРОВАННЫХ МЫШЕЧНЫХ ТКАНЕЙ

Кулибаба Е.В., Разумнова А.Ю., Петров С.А.

*Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова, Одесса, Украина
E-mail: Lenuka.87@mail.ru*

В статье представлены результаты исследования активности трансаминаэз и динамика изменения содержания белка в мышечных тканях при аллотрансплантации гомологичных эмбриональных тканей. Установлено, что трансплантация эмбриональной мышечной ткани к взрослой особи не приводит к изменениям трансаминаэзной системы в мышечных тканях.

Ключевые слова: аллотрансплантация, трансаминаэзы, белок, мышечные ткани.

ВВЕДЕНИЕ

Эмбриональным тканям присущи характерные морфологические и биохимические особенности. Они состоят, в основном, из бластных и стволовых клеток, которым присуща низкая антигенность и высокий пролиферативный и энергетический потенциал [1]. Современными исследованиями в области экспериментальной и клинической медицины созданы серьёзные предпосылки для трансплантации эмбриональной ткани и клеток с целью стимуляции и восстановления утраченных функций тканей [2]. Установлено положительное влияние эмбриональных трансплантантов на репарационные процессы в тканях, в связи с улучшением энергообеспечения [3]. Аминотрансферазы – ферменты, катализирующие реакцию переноса аминогруппы (NH_2 -группы) вместе с протоном (ионом водорода) и парой электронов от аминокислот или аминов к кетокислотам или другим соединениям, содержащим в составе своей молекулы карбонильную группу (CO -группу). Биологическая роль аминотрансфераз чрезвычайно велика, т.к. они участвуют в трансаминировании – процессе, имеющем важнейшее значение для энергетического обмена и азотистого обмена. В связи с указанным мы исследовали активности трансаминаэз и динамику изменения содержания белка в мышечных тканях при аллотрансплантации гомологичных эмбриональных тканей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования выполнены на 72 половозрелых крысах, самцах, массой 180-300 г. В работе соблюдены требования Европейской конвенции о защите животных, которые используются в экспериментальных целях. Хирургическое вмешательство проводили в стерильных условиях. Операционное поле обрабатывалось раствором

йодобака. Для получения эмбрионов использованы самки со сроком беременности 3-4 недели. У эмбрионов была взята брюшная мышечная ткань, которая подшивалась к гомологичной ткани взрослой крысы. Такая же процедура проводилась и с бедренной мышечной тканью. Трансплантация однопомётной ткани осуществлялась также. В этом случае донором служила особь взрослой крысы, взятая из одного помёта. При ложной операции осуществлялось хирургическое вмешательство без подсадки тканей. Операционную рану зашивали наглухо, простым узловым швом. Накладывалась асептическая повязка [4]. Животных выводили из эксперимента, путём пропускания электрического тока через продолговатый мозг.

Активность АЛТ и АСТ определяли с помощью метода Райтмана. Принцип метода определения АЛТ основан на аминировании 2-оксоглутаровой кислоты L-аланином, которое происходит под действием аланинаминотрансферазы. При этом образуется L-глутаминовая и пировиноградная кислоты. Определение базируется на измерении оптической плотности 2,4-динитрофенилгидразинов 2-оксоглутаровой и пировиноградной кислот в щелочной среде. Принцип метода определения АСТ заключается в аминировании 2-оксоглутаровой кислоты L-аспарагиновой кислотой, под действием аспартатаминотрансферазы. При этом образуется L-глутаминовая и щавелевоуксусная кислоты, последняя декарбоксилируется с образованием пировиноградной кислоты. Определение базируется на измерении оптической плотности 2,4-динитрофенилгидразинов 2-оксоглутаровой и пировиноградной кислот в щелочной среде [5-7].

Белок определяли по методу Лоури [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Прежде всего мы решили определить количество белка в динамике у ложнооперированных животных. Как видно из табл.1, в бедренной мышечной ткани к 7-ым суткам после операции количество белка увеличивалось в 2 раза относительно контроля. В брюшной мышечной ткани показатели содержания белка также превышали контрольные значения в 2,5 раза к 7-ым суткам.

Таблица 1
Содержание белка у крыс при ложной операции (мг белка/г ткани)

	Бедренная мышца	Брюшная мышца
Контроль	3,9±0,1	3,3±0,2
1 сутки	5,7±0,8*	6,4±0,6*
3 сутки	6,7±0,7*	6,6±0,6*
7 сутки	8,6±0,2*	8,9±0,5*

Примечание: *Р-достоверно по отношению к контролю.

В табл. 2 представлены результаты определения содержания белка при подсадке ткани, взятой у животного из одного помёта, которые свидетельствуют об увеличении содержания белка во все сроки. К 7-ым суткам после трансплантации во всех исследуемых мышечных тканях этот показатель в 2-2,5 раза превышал контрольные значения. Сравнивая содержание белка между бедренной мышечной тканью донора и акцептора можно отметить достоверное превышение исследуемых

ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ ТРАНСАМИНАЗ И СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКА...

показателей в бедренной мышечной ткани акцептора. В брюшной мышечной ткани такая картина наблюдалась на 1,3 сутки после трансплантации.

Таким образом, подсадка мышечных тканей у однопомётных крыс и при ложной операции приводит к увеличению содержания белка относительно контроля.

Такая картина связана с усилением reparационных процессов после хирургического вмешательства, что приводит к усилению биосинтеза белка.

Таблица 2

Содержание белка в тканях крыс при подсадке ткани, взятой у животных из одного помёта (мг белка/ г ткани)

	Бедренная мышца акцептора	Бедренная мышца донора	Брюшная мышца акцептора	Брюшная мышца донора
Контроль	3,9±0,1	3,9±0,1	3,3±0,2	3,3±0,2
1 сутки	7,8±0,5*	5,7±0,4*, **	7,6±0,7*	4,9±0,3*, **
3 сутки	9,1±0,2*	6,7±0,4*, **	9,3±0,3*	6,4±0,7*, **
7 сутки	8,6±0,08*	6,5±0,9*, **	8,7±0,2*	7,2±0,4*

Примечание:

*Р₁-достоверно по отношению к контролю,

**Р₂-достоверность между мышечной тканью донора и акцептора.

При трансплантации эмбриональной мышечной ткани (табл.3) установлено достоверное увеличение содержания белка к 7-ым суткам эксперимента в бедренной мышце донора и в брюшной мышце акцептора. В бедренной мышце акцептора такое увеличение исследуемого показателя происходило к 3-им суткам исследования. В брюшной мышце донора достоверных изменений относительно контроля не происходило. Сравнивая содержание белка между бедренной и брюшной мышцами акцептора и донора можно отметить, что в исследуемых тканях донора его существенно меньше после трансплантации на 1-ые сутки эксперимента. На 3-и и 7-ые сутки достоверных изменений отмечено не было.

Таблица 3

Содержание белка в тканях крыс при подсадке эмбриональной ткани (мг белка/ г ткани)

	Бедренная мышца акцептора	Бедренная мышца донора	Брюшная мышца акцептора	Брюшная мышца донора
Контроль	3,9±0,1	1,8±0,2**	3,3±0,2	2,0±0,1**
1 сутки	3,8±0,1	1,7±0,3**	3,7±0,1	1,8±0,2**
3 сутки	4,4±0,1*	3,2±0,8	3,0±0,8	2,3±0,3
7 сутки	4,1±0,1	4,5±0,4*	4,9±0,3*	3,5±0,8

Примечание:

*Р₁-достоверно по отношению к контролю,

**Р₂-достоверность между мышечной тканью акцептора и донора.

Получив вышеуказанные результаты, мы решили выяснить, за счёт чего происходят такие изменения. Возможно, они реализуются за счёт пополнения фонда аминокислот в тканях, происходящие в реакциях трансамигрирования.

Исследования активности АЛТ (табл.4) в исследуемых тканях показали, что при ложной операции достоверных изменений отмечено не было.

Таблица 4
Активность АЛТ при ложной операции (мкмоль/ ч×мг ткани)

	Бедренная мышца	Брюшная мышца
Контроль	0,22±0,05	0,18±0,05
1 сутки	0,17±0,05	0,15±0,05
3 сутки	0,17±0,05	0,13±0,05
7 сутки	0,21±0,05	0,17±0,05

Как видно из данных табл. 5 при подсадке мышечных тканей, взятых у однопомётных крыс наблюдалось достоверное снижение показателей к 7-ым суткам эксперимента в бедренной и брюшной мышечных тканях донора. Сравнивая изучаемые показатели между донором и акцептором можно отметить, что в бедренной мышце донора во все исследуемые сроки активность АЛТ была достоверно меньше по сравнению с бедренной мышцей акцептора. В брюшной мышце донора такая картина наблюдалась на 3-7 сутки после трансплантации.

Таблица 5
Активность АЛТ в тканях крыс при подсадке ткани, взятой у животных из одного помёта (мкмоль/ ч×мг ткани)

	Бедренная мышца акцептора	Бедренная мышца донора	Брюшная мышца акцептора	Брюшная мышца донора
Контроль	0,22±0,05	0,22±0,05	0,18±0,05	0,18±0,05
1 сутки		0,08±0,01*, **	0,12±0,05	0,07±0,01
3 сутки	0,25±0,05	0,04±0,01*, **	0,16±0,05	0,04±0,01*, **
7 сутки	0,21±0,05	0,03±0,01*, **	0,13±0,04	0,02±0,005*, **

Примечание:

*Р₁-достоверно по отношению к контролю,

**Р₂-достоверность между мышечной тканью донора и акцептора.

Иная картина наблюдалась при подсадке эмбриональных тканей. Из табл.6 видно, что в брюшной мышце донора к 7-ым суткам эксперимента активность АЛТ достоверно снижалась относительно контроля. Сравнивая активность фермента в бедренной мышечной ткани акцептора и донора можно отметить, что во все исследуемые сроки активность АЛТ была достоверно выше в бедренной мышечной ткани акцептора. Аналогичная ситуация обнаружена и в брюшной мышечной ткани акцептора.

Таблица 6

**Активность АЛТ в тканях крыс при подсадке эмбриональной ткани
(мкмоль/ чхмг ткани)**

	Бедренная мышца акцептора	Бедренная мышца донора	Брюшная мышца акцептора	Брюшная мышца донора
Контроль	**0,22±0,05	0,05±0,01	**0,18±0,05	0,08±0,01
1 сутки	**0,23±0,05	0,05±0,01	**0,17±0,05	0,05±0,01
3 сутки	**0,24±0,05	0,06±0,01	**0,19±0,05	0,05±0,01
7 сутки	**0,23±0,05	0,07±0,01	**0,15±0,05	0,03±0,01*

Примечание:

*Р₁-достоверно по отношению к контролю,

**Р₂-достоверность между мышечной тканью донора и акцептора.

Из табл. 7 и 8 видно, что ни ложная операция, ни подсадка однопомётной ткани не приводит к достоверным изменениям исследуемых показателей.

Таблица 7

Активность АСТ при ложной операции (мкмоль/ чхмг ткани)

	Бедренная мышца	Брюшная мышца
Контроль	0,17±0,05	0,15±0,05
1 сутки	0,14±0,05	0,08±0,01
3 сутки	0,09±0,02	0,11±0,05
7 сутки	0,16±0,05	0,14±0,05

Таблица 8

**Активность АСТ в тканях крыс при подсадке ткани, взятой у животных из
одного помёта (мкмоль/ чхмг ткани)**

	Бедренная мышца акцептора	Бедренная мышца донора	Брюшная мышца акцептора	Брюшная мышца донора
Контроль	0,17±0,05	0,17±0,05	0,15±0,05	0,15±0,05
1 сутки	0,14±0,05	0,11±0,04	0,12±0,05	0,09±0,01
3 сутки	0,16±0,05	0,08±0,01	0,14±0,05	0,08±0,01
7 сутки	0,13±0,05	0,08±0,01	0,12±0,05	0,06±0,005

Подсадка эмбриональной ткани (табл. 9) не оказывает влияния на активность АСТ в исследуемых тканях донора и акцептора.

Таблица 9

**Активность АСТ в тканях крыс при подсадке эмбриональной ткани
(мкмоль/ чхмг ткани)**

	Бедренная мышца акцептора	Бедренная мышца донора	Брюшная мышца акцептора	Брюшная мышца донора
Контроль	0,17±0,05	0,10±0,05	0,15±0,05	0,08±0,01
1 сутки	0,15±0,05	0,08±0,01	0,15±0,05	0,08±0,01
3 сутки	0,17±0,05	0,10±0,04	0,17±0,05	0,09±0,01
7 сутки	0,17±0,05	0,10±0,05	0,15±0,05	0,07±0,01

ВЫВОДЫ

1. Подсадка мышечных тканей однопомётных крыс также как и при ложной операции приводит к увеличению содержания белка в изучаемых тканях относительно контроля.
2. Трансплантация эмбриональной мышечной ткани приводит к увеличению содержания белка во всех исследуемых тканях во все сроки исследования.
3. Трансплантация эмбриональной мышечной ткани к взрослой особи не приводит к изменениям трансаминазной системы в мышечных тканях.
4. Очевидно, нарастание содержания белка в мышечных тканях после аллотрансплантации связано с интенсификацией биосинтеза белка за счёт имеющегося фонда свободных аминокислот.

Список литературы

1. Костный мозг как источник получения мезенхимальных клеток для восстановительной терапии повреждённых органов / В.И. Шумаков, Н.А. Онищенко, Н.Е. Крашенинников [и др.]. – Вест, трансплант. и искусств. орг. – 2002. – №4. – С. 3–6.
2. Александрова М.А. Поведение трансплантированных эмбриональных клеток. / М.А. Александрова, Е.В. Лосева, И.В. Ермакова // Онтогенез. – 1993. – Т.24, №5. – С. 43–50.
3. Мазур О.Е. Порівняльна характеристика процесів енергообміну та біосинтезу деяких ембріональних тканей і клітин / О.Е. Мазур // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2000. – №4. – С. 44–47.
4. Буянов В.М. Хирургический шов / В.М. Буянов, В.Н. Егиев, О.А. Уотов [учебное пособие] – Санкт-Петербург, 2001. – С. 112.
5. Reitman S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases / S. Reitman, S. Frankel // Am.J.Clin.Pathol – 1957. – P. 28, 56.
6. Tietz N.W. Clinical guide to laboratory tests, 2nd ed. Saunders Co / N.W. Tietz // Textbook Of Clinical Chemistry – 1991. – P. 20–21.
7. Friedman R.B. Effects of disease on clinical laboratory tests / R.B. Friedman, D.S. Young // 3rd Edition, AACC Press.-Washington – 1997. – P. 21.
8. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.I. Rosenbrough, A.Z. Fan [et. al]. // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193 – P. 265–275.

Кулібаба О.В. Вивчення активності трансаміназ і вмісту білка при аллотрансплантації ембріональних і сформованих м'язових тканин / О.В. Кулібаба, А.Ю. Разумнова, С.А. Петров // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2012. – Т. 25 (64), № 3. – С. 103-108.

У статті представлені результати дослідження активності трансаміназ і динаміка зміни вмісту білка в м'язових тканинах при аллотрансплантації гомологічних ембріональних тканин. Встановлено, що трансплантація ембріональної м'язової тканини до дорослої особини не призводить до змін трансаміназної системи в м'язових тканинах.

Ключові слова: аллотрансплантація, трансамінази, білок, м'язові тканини.

Kulibaba E.V. Study of transaminase activity and protein content in allotransplantation embryonic and formed muscle tissue / E.V. Kulibaba, A.Y. Razumnova, S.A. Petrov // Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No 3. – P. 103-108. The article presents the results of research activity of enzymes and of changes in protein content in muscle tissue at allotransplantation homologous embryonic tissues. Found that transplantation of embryonic muscle tissue to the adult individual does not change transaminaznoy system in muscle tissues.

Keywords: allotransplantation, transaminase, protein, muscle tissue.

Поступила в редакцию 29.09.2012 г.

Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского
Серия «Биология, химия». Том 25 (64). 2012. № 3. С. 109-114.

УДК 595.384.12(262.5)

**МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КРЕВЕТОК
PALAEMON ADSPERSUS И *PALAEMON ELEGANS* (PALAEMONIDAE) ИЗ
ЧЕРНОМОРСКИХ ВОД ЮГО-ЗАПАДНОГО КРЫМА (М. КАЯ-БАШ И
БАЛАКЛАВСКАЯ БУХТА)**

Лисицкая Л.А.

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

В 2010 – 2011 гг. в акватории м. Кая-Баш обнаружены креветки только одного вида семейства Palaemonidae – *Palaemon elegans*. В Балаклавской бухте – два вида: *P. adspersus* и *P. elegans*. Численность *P. adspersus* составила более 90% выборки. Данна морфометрическая характеристика креветок. Изучено развитие личинок *P. elegans*, приведены их размеры и описание по стадиям.

Ключевые слова: креветки, Palaemonidae, личиночное развитие, Чёрное море.

ВВЕДЕНИЕ

Усиление антропогенной нагрузки на Черное море и особенно на его прибрежные районы вызывает негативные изменения в экосистемах и приводит к уменьшению видового разнообразия, снижению численности многих видов морских животных [1, 2]. В то же время появляются новые виды, завезенные судами с балластными водами [3]. Следовательно, для контроля состояния сообществ бентали и пелагиали необходимо проводить регулярные исследования видового разнообразия различных таксономических групп. Важной составной частью прибрежных биоценозов являются креветки рода *Palaemon* (Decapoda, Palaemonidae), многие из них имеют значительное промысловое значение [4].

Цель работы – изучение видового состава, морфологии и элементов личиночного развития креветок семейства Palaemonidae, обитающих в прибрежных водах Крыма.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал собран у мыса Кая-Баш и в Балаклавской бухте (юго-западный Крым) в летне-осенний период 2010–2011 гг. (рис. 1).



Рис. 1. Схема районов исследования.

Мыс Кая-Баш находится в районе Гераклейского полуострова, где отмечены слабонарушенные наземные и морские фитоценозы с высоким флористическим разнообразием. В силу его удаленности от городской черты и недавнего особого военного статуса – это наиболее сохранившийся район Гераклейского п-ова [5]. Балаклавская бухта расположена в юго-западной части Крымского полуострова между мысами Айя и Фиолент. Её протяженность составляет около 1,2 км, ширина до 200 м. Результаты комплексных исследований, обедненный видовой состав фитообрастаний гидротехнических сооружений, количественное преобладание зеленых водорослей свидетельствуют о загрязненности Балаклавской бухты [1, 5]. Таким образом, сбор материала выполнен нами в двух районах, отличающихся как по расположению (открытый берег моря и полузамкнутая бухта), так и по степени антропогенной нагрузки.

Для отлова креветок использовали сачок (диаметр входного отверстия 28 см, размер ячей мельничного газа 135 мкм). Определение видовой принадлежности проводили под бинокуляром МБС-9. Для изучения личиночного развития самок *P. elegans* содержали в кристаллизаторах (объём 2 л) с морской водой. Воду меняли ежедневно, воздух подавали круглосуточно компрессором. После выклева личинок пересаживали в кристаллизаторы объёмом 100 мл. Ежедневно их просматривали под бинокуляром, измеряли с помощью окуляр-микрометра. Биологический анализ и морфометрия креветок проведены по методике Р.Н. Буруковского [6]. Всего определено и измерено 220 креветок, относящихся к семейству Palaemonidae.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В состав семейства Palaemonidae входит большое количество родов, распространенных во многих районах Мирового океана. В Чёрном море было обнаружено три вида только одного рода *Palaemon* (*P. adspersus*, *P. elegans*, *P. serratus*) [4, 7]. В 2005 г. у побережья Синопского полуострова (Турция) найдены креветки вида *P. longirostris* [8]. В 2009 г. у берегов Румынии обнаружен вид *P. macrodactylus* [9]. Таким образом, в настоящее время известно 5 видов креветок рода *Palaemon*, обитающих в Чёрном море.

Нами были обнаружены креветки двух видов: *P. elegans* и *P. adspersus*. У м. Кая-Баш как в 2010, так и в 2011 гг. встречались креветки только одного вида -

P. elegans. В июле 2010 г. (выборка 39 особей) их минимальная длина тела от глазных орбит до конца тельсона (ОД) составляла 14 мм, максимальная – 41 мм, средняя – $26,2 \pm 2,6$ мм. Средняя длина карапакса составила $6,9 \pm 0,7$ мм. Средняя длина рострума от терминального конца до орбит – $6,9 \pm 0,8$ мм. В 2011 г. у м. Кая-Баш (выборка 66 особей) минимальная длина тела *P. elegans* равнялась 21мм, максимальная достигла 38 мм, средняя – $30,1 \pm 0,9$ мм. Размеры общей длины тела креветок в 2010 и 2011 гг. практически не отличались. Количество дорсальных зубцов рострума составляло 6-8, посторбитальных – 3, центральных – 2-5, терминальных – 2 (за исключением поврежденных рострумов). Средняя длина карапакса равна $7,6 \pm 0,3$ мм, длина рострума – $7,6 \pm 0,5$ мм. Длина рострума находится в прямой зависимости от длины карапакса. В июле 2011 г. самки составляли 80,3 %, самцы – 19,7% выборки.

Размерная характеристика *P. elegans*, отловленных в акватории м. Кая-Баш в 2010 г., может свидетельствовать о наличии трех генераций. Креветки, входящие в состав первой генерации, являются ювенильными, а второй и третьей – половозрелыми. В июле 2011 г. в пробах преобладали половозрелые особи.

В Балаклавской бухте встречались креветки двух видов – *P. adspersus* и *P. elegans*. В 2010 г. численность *P. adspersus* составила 95,9% выборки, в 2011 г. – 90,9%; а *P. elegans* соответственно 4,1% и 9,1%. В октябре 2010 г. (выборка 49 особей) у *P. adspersus* из Балаклавской бухты минимальная длина тела от глазных орбит до конца тельсона была равна 21 мм, максимальная – 40 мм, средняя – $28,4 \pm 1,2$ мм. Рострум хорошо развит, его средняя длина от терминального конца до орбит – $8,5 \pm 0,4$ мм. Отмечена высокая корреляция ($K=0,85$) между длиной тела и длиной рострума. Средняя длина карапакса $6,8 \pm 0,4$ мм. Количество дорсальных зубцов рострума 5-6, из них 1 посторбитальный, центральных зубцов – 3-4. Корреляция между количеством центральных и дорсальных зубцов рострума отсутствует ($K=-0,19$). Рассчитанный показатель точности данной выборки $C_s=2,1\%$ меньше 5%. Следовательно, размер выборки достаточный и точность средних величин удовлетворительна. Показатели асимметрии (0,56) и эксцесса (0,06) оказались довольно низкими, что указывает на то, что распределение близко к нормальному. Средний размер креветок *P. elegans* достигал $40,5 \pm 2,9$ мм, минимальный – 39 мм, максимальный – 42 мм. Средняя длина рострума от терминального конца до орбит – $8,5 \pm 0,9$ мм. Количество дорсальных зубцов рострума 6-7, посторбитальных – 3, центральных – 3, терминальных – 2.

В сентябре 2011 г. (выборка 66 особей) зарегистрированы следующие размеры: минимальная длина тела *P. adspersus* – 27 мм, максимальная – 50 мм, средняя – $35,1 \pm 1,2$ мм. На долю самцов приходилось 71,7% выборки. Средняя длина тела *P. adspersus* в 2011 г. была на 7 мм больше, чем в 2010 г. Количество дорсальных зубцов рострума 5-6, посторбитальных – 1, центральных 3-4, терминальных – 2. Средняя длина карапакса составила $8,4 \pm 0,4$ мм, длина рострума – $9,7 \pm 0,4$ мм. Размеры креветок *P. elegans*: минимальная длина тела – 26 мм, максимальная – 30 мм, средняя – $28,2 \pm 1,4$ мм. Все экземпляры были половозрелыми.

Исследовано содержимое желудков *P. adspersus* и *P. elegans*. В пищевых комках темно-коричневого цвета отмечены обрывки хитина, фрагменты антенн и

конечностей ракообразных, видовую принадлежность которых установить не удалось, так как они были сильно макерированы. В желудках преобладали детрит и растительные остатки. Степень наполнения желудков, определенная по 4-х балльной шкале [10], соответствовала 2–3 баллам, что свидетельствует о достаточном количестве пищи.

Можно предположить, что на распределение видового состава креветок рода *Palaemon* в исследуемых акваториях повлияла разница в таксономическом составе макрофитов, указанная для мыса Кая-Баш и Балаклавской бухты [5].

Личночное развитие креветки *P. elegans*

Половозрелые особи креветки *P. elegans* имели размеры тела (ОД) более 23 мм. Во время отбора проб встречались самки с икринками, находящимися на разных стадиях развития. Икринки были прикреплены к плеоподам, имели овальную форму, их размеры на 1 и на 5 стадиях эмбрионального развития существенно не различались и достигали в ширину 480 – 625 мкм, в длину – 600 – 775 мкм.

В лабораторных условиях нами получены личинки *P. elegans*. Размеры зоэа на 1 стадии составляли в длину 2900 – 3000 мкм. Тело полупрозрачное, на карапаксе хорошо видны хроматофоры оранжевого цвета. Карапакс гладкий, рострум не вооружен шипами, глаза сидячие. Плеоподы отсутствовали, на пятом сегменте абдомена хорошо заметны латеральные шипы. Тельсон расширен в дистальной части, на нём расположено 14 перистых щетинок. На 2 сутки у личинок произошла линька и они перешли во 2 стадию.

На 2 стадии у зоэа появился 1 дорсальный шип на карапаксе и 1 супраорбитальный. Глаза стали стебельчатыми. Переоподы с эндоподитами, вооруженными перистыми щетинками. Общая длина – 3000 – 3200 мкм, ширина – 480 – 500 мкм. На 5–6 сутки произошла линька.

На 3 стадии длина зоэа составляла 2900 – 3375 мкм, ширина 500 – 550 мкм. Появился ещё один дорсальный шип на карапаксе. На тельсоне осталось 12 перистых щетинок, заметны уроподы, не превышающие края тельсона. Уроподы состояли из двух широких пластинок, снабженных перистыми щетинками, экзоподит по размеру больше эндоподита и снабжен 9 щетинками на латеральном крае.

В 4 стадию зоэа перешли на 9 сутки. Общая длина составляла 3450–3600 мкм, ширина 575 – 625 мкм. На карапаксе появился третий дорсальный шип. Начали дифференцироваться плеоподы. Тельсон стал более узким относительно начальных стадий, с 8 щетинками на краю. Увеличилась длина уропод, количество щетинок на эндоподите – 11.

К 5 стадии длина зоэа достигала 3800 – 3900 мкм, ширина составила 550 – 600 мкм. Глаза на хорошо выраженном стебельке. Заметны желтые и оранжевые хроматофоры на абдомене, глазных стебельках и карапаксе. Экзоподит и эндоподит уропод примерно одного размера с длинными перистыми щетинками.

Развитие личинок *P. elegans* с 1 по 5 стадию длилось в течение 16 суток. По литературным же данным, метаморфоз *P. elegans* до перехода во взрослое состояние проходит за 26 суток [11]. Размеры тела изменялись во время линьки, когда

сбрасывался экзоскелет. В имеющихся ранее работах продолжительность личиночных стадий и размеры личинок не указывались [4, 12]. Полученные нами данные показали, что размеры икринок, длина и ширина зоэа креветок *P. elegans*, обитающих у берегов Крыма и у берегов Турции, практически не отличаются [11].

ВЫВОДЫ

1. В 2010 – 2011 гг. в акватории м. Кая-Баш встречались креветки только одного вида – *P. elegans*, в Балаклавской бухте – двух видов: *P. adspersus* и *P. elegans*.
2. Численность *P. adspersus* в Балаклавской бухте в 2010 г. составила 95,9% выборки, в 2011 г. – 90,9%; а *P. elegans* – 4,1% и 9,1% соответственно.
3. У креветок *P. adspersus* отмечена высокая корреляция между длиной тела и длиной рострума (0,85). Корреляция между количеством вентральных и дорсальных зубцов рострума отсутствует (-0,19).
4. Метаморфоз личинок *P. elegans* с 1 по 5 стадию длился в течение 16 суток. Размеры личинок на 1 стадии составляли 2900 - 3000 мкм, к 4 – 5 стадиям увеличились до 3800 – 3900 мкм.

Список литературы

1. Миронов О.Г. Санитарно-биологические аспекты экологии Севастопольских бухт в XX веке / Миронов О.Г., Кириюхина Л.Н., Алёмов С.В. – Севастополь : ЭКОСИ-Гидрофизика, 2003. – 185 с.
2. Ревков Н.К. Таксономический состав донной фауны крымского побережья Черного моря. Современное состояние биоразнообразия прибрежных вод Крыма (черноморский сектор) / Ревков Н.К. – Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2003. – С. 209–218.
3. Александров Б.Г. Проблема переноса водных организмов судами и некоторые подходы к оценке риска новых инвазий / Б.Г. Александров // Мор. экол. журн. – 2004. – Т. 3, № 1. – С. 5–17.
4. Макаров Ю.Н. Десятиногие ракообразные. Фауна Украины. Высшие ракообразные / Макаров Ю. Н. – К. : Наук. думка, 2004. – Т.26. – 430 с.
5. Сохранение природных экосистем юго-западного Крыма / [Л.В. Бондарева, Н.В. Миронова, Н.А. Мильчакова и др.] // III Международная конференция «Современные проблемы экологии азово-черноморского региона» 10-11 октября 2007 г. : Керчь: тез. докл. – Керчь : ЮГНИРО, 2008 – С. 127–135.
6. Буруковский Р.Н. Методика биологического анализа некоторых тропических и субтропических креветок / Буруковский Р.Н. // Сб. науч. тр. Всеросс. НИИ рыб. хоз-ва и океанографии. – М. – 1992. – С. 77–91.
7. Кобякова З.И. Отряд десятиногие – Decapoda. Определитель фауны Чёрного и Азовского морей / Кобякова З.И., Долгопольская М.А. – К. : Наук. Думка, 1969. – Т. 2. – С. 270–306.
8. On the presence of the non-native estuarine shrimp, *Palaemon longirostris* H. Milne-Edwards, 1837 (Decapoda, Caridea), in the Black Sea / [Sezgin Murat, Aydemir Eylem, Ates Suat et al.] // Aquatic Invasions. – 2007. – Vol. 2, Issue 4. – P. 464–465.
9. Micu Dragos. First record of the Asian prawn *Palaemon macrodactylus* Rathbun, 1902 (Caridea: Palaemonoidea: Palaemonidae) from the Black Sea / Micu Dragos, Nita Victor // Aquatic Invasions. – 2009. – Vol. 4, Issue 4. – P. 597–604.
10. Буруковский Р.Н. Питание и пищевые взаимоотношения креветок / Буруковский Р.Н. – Калининград : «КГТУ», 2009. – 409 с.
11. A preliminary study on reproductive biology of *Palaemon elegans* Rathke, 1837 along the South-eastern Black Sea Coast / [Bascinar Nimet Selda, Duzgunes Ertug, Bascinar Nadir et al.] // Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. – 2002. – No. 2. – P. 109–116.
12. Долгопольская М.А. Метаморфоз черноморских Decapoda / Долгопольская М.А. // Тр. Севаст. биол. станции. – 1954. – Т. 8. – С. 178–213.

Лисицька Л.А. Морфометрична характеристика креветок *Palaemon adspersus* і *Palaemon elegans* (Palaemonidae) з чорноморських вод південо-західного Криму (м. Кая-Баш і Балаклавська бухта) / Л.А. Лисицька // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2012. – Т. 25 (64), № 3. – С. 109-114.

У 2010 – 2011 рр. в акваторії м. Кая-Баш виявлені креветки тільки одного виду родини Palaemonidae - *Palaemon elegans*. У Балаклавській бухті - двох видів: *P. adspersus* і *P. elegans*. Чисельність *P. adspersus* становила понад 90% вибірки. Надана морфометрична характеристика креветок. Вивчено розвиток личинок *P. elegans*, наведені їх розміри й опис по стадіях.

Ключові слова: креветки, Palaemonidae, личинковий розвиток, Чорне море.

Lisitskaya L.A. Morphometric characteristic of shrimps *Palaemon adspersus* and *Palaemon elegans* (Palaemonidae) from the black sea waters of south-west Crimea (Kaya-Bash and Balaklava Bay) / L.A. Lisitskaya // Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No 3. – P. 109-114.

The shrimp of *Palaemon elegans* species (Palaemonidae) was found in 2010 – 2011 in the waters of Kaya-Bash. *P. adspersus* and *P. elegans* were found in Balaklava Bay. The number of *P. adspersus* was more than 90% of the sample. The morphometric characteristic of shrimps was presented. The development of larvae *P. elegans* was studied, their size and description of the larval development stages was given.

Keywords: shrimp, Palaemonidae, larval development, the Black Sea.

Поступила в редакцію 17.09.2012 р.

УДК 598.2.20:210.7(477.5)

СТРУКТУРА ВИДОВОГО РІЗНОМАНІТТЯ ОСТРІВНИХ УГРУПОВАНЬ ПТАХІВ СИВАШУ

Мацюра О.В., Мацюра М.В.

*Мелітопольський державний педагогічний університет імені Богдана Хмельницького,
Мелітополь, Україна
E-mail: amatsyura@gmail.com*

Було виконано аналіз острівних угруповань птахів із використанням основних екологічних параметрів - індексу видового різноманіття, значення концентрації домінування та індексу відносної вирівненості. Це дозволило виявити відмінності в структурі угруповань, що обумовлені їх якісним і кількісним складом. Відмінності в просторовій структурі острівних угруповань птахів визначаються кількістю домінуючих за чисельністю видів та їх значущістю в угрупованнях. В умовах острівних систем, коли площи, придатні для гніздування, обмежені, а територіальна конкуренція збільшується, види-домінанти визначають видове різноманіттє угруповань птахів.

Ключові слова: острови, угруповання птахів, видове різноманіттє, домінування, вирівненість.

ВСТУП

Одним із найважливіших завдань сучасної орнітології залишається доскональне вивчення орнітофауни конкретних регіонів і в першу чергу територій, які збереглися в природному стані. В умовах постійного посилення антропогенного пресу зростає необхідність вивчення стану окремих фауністичних комплексів з метою розробки заходів для їх охорони. Такими комплексами є острівні системи, що являють собою цінність як в екологічному, так і в зоогеографічному відношенні. Острівні системи, будучи частиною водно-болотних угідь, є компонентами ландшафту, що мають високу уразливість й обмежені можливості до самовідновлення. З іншого боку, вони характеризуються як прекрасні модельні ділянки для моніторингу та управління, зважаючи на обмеженість території й високу концентрацію навколоводних видів птахів, що колоніально гніздяться.

У сучасній екологічній літературі питанню значення та інтерпретації індексів видового різноманіття присвячений ряд робіт, де проводиться серйозний аналіз і обговорення використання цих показників в екосистемних дослідженнях. Детальний огляд часто вживаних індексів зроблений Fager [1], який обговорював лінійну залежність для декількох найбільш часто вживаних індексів. Досить часто вживався індекс видового різноманіття. За твердженням Whittaker [2], "це єдина об'єктивна міра різноманітності".

Хоча різноманітність вважається автоматичною властивістю угруповання [3-6], подальші роботи [7, 8] обґрунтували, що різноманітність, в реальності, це досить невизначена концепція, яка об'єднує два різних і часто незалежно варіюваних

компоненту: число видів і розподіл достатку між ними. Індекси різноманітності - це, в принципі, мультиваріантний аналіз індивідуальних організмів через види. По суті, привабливість індексів в тому, що вони дозволяють скоротити обсяг інформації для більшої кількості даних до простих чисел.

На думку низки екологів, для порівняльного аналізу більш доцільно використовувати прості індекси - D і S (індекс видового різноманіття та просто число видів). Для складання менеджмент-плану водно-болотних угідь цілком достатньо певного набору даних. Для орнітocomплексів це число видів, чисельність і дані по динаміці чисельності [1, 9-12]. Наведені вище показники інтерпретують цю інформацію, дозволяючи використовувати її для порівняльного аналізу орнітocomплексів і прогнозувати зміни чисельності всіх видів, складових угруповання, так само як і окремих модельних видів. Збір великого числа інформації з використанням багатьох екологічних параметрів вимагає значних витрат часу і ресурсів, що ускладнює процес обробки даних, роблячи його громіздким і трудомістким.

Під час розгляду структури орнітocomплексів ми дотримувалися визначення В.П. Мазінга [13], який виділяє в один з напрямків структури біогеоценозу його склад: популяційно-видовий, екобіоморфний і ценотичний. Керуючись Програмою і методикою біогеоценологічних досліджень [14], яка визначила три аспекти в організації біогеоценотичних систем, нами були обрані основні напрямки досліджень та аналізу острівних орнітocomплексів, а саме: структурно-фізичний (просторове угруповання і розміщення птахів); функціональний - їх взаємовідносини; часовий - динаміка їх чисельності. Таким чином, вибір видового складу і чисельності птахів, що гніздяться, як структурних елементів угруповання нам видається цілком обґрунтованим і коректним.

Дане дослідження ставило перед собою завдання довести можливість проведення аналізу орнітocomплексів з подальшою розробкою рекомендацій по їх охороні та управлінню, оперуючи доступними даними, збір яких не вимагає спеціального устаткування і значних витрат. Як було зазначено вище, видове багатство є однією зі складових видової різноманітності. Індекс видової різноманітності Маргалефа, на наш погляд, є найбільш підходящим, враховуючи логарифмічну залежність між числом видів і числом особин для більшості угруповань [11]. Для відображення відносної вирівненості, як іншої, не менш важливої складової видового різноманіття, застосований індекс відносної вирівненості Післоу, що, на нашу думку, найбільш повно і достовірно відображає характер розподілу видів за чисельністю [5]. Індекс домінування Сімпсона дозволив кількісно виразити концентрацію чисельності птахів серед декількох найбільш значущих видів з подальшою можливістю порівняльного аналізу орнітocomплексів за цим показником [12].

У ході роботи була досліджена та проаналізована структура видового різноманіття птахів на рівні угруповань та визначені основні чинники, що обумовлюють взаємозв'язки між структурними компонентами. Для даного регіону дослідження видового різноманіття та структури орнітocomплексів виконувались в рамках комплексної тематики, низка робіт була присвячена проблемам аналізу

динаміки колоніальних птахів [15-18], проблемі стійкості угруповань колоніальних птахів [19], проблемам консортивних зв'язків в колоніях птахів [20], аналізу характеру міжвидових зв'язків птахів в колоніях [21], аналізу просторового розподілу птахів [22-24].

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Основний матеріал було зібрано нами в період з 1993 по 1998 р., використано відомості за 1973-1993 рр. [15]. Дослідження були проведені на базі Азово-Чорноморської орнітологічної станції Інституту зоології ім. І.І. Шмальгаузена НАН України і Мелітопольського державного педагогічного університету імені Богдана Хмельницького. Усього було обстежено 34 острівні системи загальною площею 667 га (Центральний, Східний та Західний Сиваш).

Нами були обстежені наступні ділянки: острів Танін, Каржинські острови, Каланчацькі острови, Каргазакські острови - затоки Джарилгач і Каркінітська (Скадовський і Каланчацький р-ни Херсонської обл.); острови Зміїні, острови озера Сивашівка, острів Китай, острів Чурюк, острів Куок-Тук, острови коси Тюп-Тархан, острови у Заозерному, острови озер Айгульське і Карлеутське - Центральний Сиваш (Генічеський р-н Херсонської обл. та Джанкойський р-н Криму); Чонгарські острови, острови Сальково, Генічеські острови, острови Коянли, острови Полігонні, Арабатські острови, острови у Придорожньому, острови у Єрмаково, острови Солепрому, острови півострову Верблюдка - Східний Сиваш (Джанкойський, Нижньогірський, Радянський, Кіровський, Ленінський р-ни Криму, Генічеський р-н Херсонської обл.); Строганівські острови (Чаплинський район Херсонської обл.), острови Молочного лиману (Якимівський р-н Запорізької обл.), острови Обитічної затоки (Приморський р-н Запорізької обл.). Детальне розташування островів наведено в [15].

Щорічний облік чисельності птахів, що колоніально гніздяться, проводився переважно двома способами: шляхом підрахунку гнізд і шляхом підрахунку зустрінутих птахів на певному відрізку берегової лінії, що визначалося доступністю колоній. У низці місць застосовувався суцільний підрахунок гнізд при детальному огляді території. У розріджених колоніях, на ділянках з рідкою рослинністю або без неї, на черепашкових пляжах проводився підрахунок насиджуючих птахів у біонокль; в колоніях, розташованих у густій рослинності, гнізда птахів враховувалися шляхом спостережень за злітаючими та сідаючими птахами.

В залежності від типу гніздування застосовувалися різні методи обліків птахів [25-26]. Для птахів, що колоніально гніздяться, застосовувалися:

- метод абсолютноного обліку птахів в колоніях (для невеликих за чисельністю);
- метод часткового обліку (повний підрахунок гнізд проводився тільки на одній з ділянок колонії, а потім екстраполювався на всю зйману територію; застосовувався у великих за чисельністю поселеннях);

Проводилося картування островів після їх промірів: встановлювалися розмірні характеристики площ, зайнятих гніздами, визначалися домінуючі рослинні асоціації з урахуванням площі проективного покриття, простежувалась динаміка конфігурації берегової лінії.

Всі спостереження і розрахунки були проведені за колоніальними навколоводними птахами, що заселяють острови і коси північно-західного узбережжя Азовського моря, острівні ділянки Сиваша і деякі острови, розташовані в Джарилгацькій і Каркінітській затоках Чорного моря. Всього було обстежено 34 острівні системи загальною площею 667 га.

Паралельно з обліками птахів фіксувалися наступні параметри - особливі умови впливу на гніздові ділянки або комплекси біотопів: вплив хижаків, антропогенний прес, ступінь вітрової і хвильової ерозії. Площа острівних систем визначалася виходячи з власних промірів островів. Низка острівних систем характеризувалася щорічною зміною площ і конфігурації в силу впливу вітрової і хвильової ерозії; для таких острівних систем дані бралися з топографічних карт 1987 року, масштаб 1: 50000.

В основу характеристики орнітокомплексів було покладено порівняння, засновані на індексах різноманітності, що представляють собою відношення залежності між числом видів і їх значимістю. При цьому бралися до уваги два основні компоненти видової різноманітності - видове багатство і відносна вирівненість (розділ особин серед видів). Згідно з Утегером [2], одними з напрямків вивчення структури угруповань є значимість видів і видове різноманіття.

Математичний апарат досліджень визначили такі показники різноманіття:

1) індекс видового багатства Маргалефа [11]:

$$D = S-1 / \log N, \quad (1)$$

де S - число видів; N - число особин;

2) індекс домінування Сімпсона [12]:

$$c = \Sigma (n_i / N)^2, \quad (2)$$

де n_i - оцінка значущості виду (чисельність пар, що гніздяться); N - сума оцінок значущості (загальна чисельність угруповання птахів у парах);

3) інформаційний індекс Шенона [6]:

$$H' = - \sum P_i \log P_i, \quad (3)$$

де P_i - значущість виду в десяткових долях як відношення його чисельності до загальної чисельності угруповання;

4) індекс вирівненості Пієлоу [5]:

$$e = H' / \log S, \quad (4)$$

де H' - індекс Шенона; S - число видів.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Одним із важливих завдань моніторингових досліджень водно-болотних угідь є характеристика угруповань птахів за показниками видового різноманіття [27]. Різноманіття об'єднує два різні і часто незалежні компоненти - число видів і

розподіл кількості між ними. Проведення аналізу угруповань птахів із використанням основних екологічних параметрів - індексу видового різноманіття, значення концентрації домінування та індексу відносної вирівненості дозволили виявити відмінності в структурі угруповань, що обумовлені їх якісним і кількісним складом. Чисельність птахів було логарифмовано (використання десяткового логарифму відображає загальну закономірність розподілу видів).

У ході аналізу відмічено такі закономірності:

- відносну кількість і видове різноманіття необхідно розглядати в різному контексті при оцінці значущості острівних угруповань птахів;
- із збільшенням числа видів не спостерігається пропорційного збільшення показника видового різноманіття у зв'язку із зростанням складності угруповань птахів й особливостями домінування та вирівненості видів в угрупованні;
- найбільшими показниками видового різноманіття характеризуються острівні угруповання птахів, що знаходяться в межах охоронних територій або на значному віддаленні від материка, тобто з обмеженим впливом фактора турбування з боку хижаків і людини.

Використання індексу відносної вирівненості дозволило визначити відмінності просторової структури угруповань. На відміну від індексу видового різноманіття, при розрахунках приймається до уваги не абсолютна чисельність видів (у парах), а відносна значущість (у десяткових дробах), тобто відношення чисельності видів до загальної чисельності птахів угруповання. Значення індексу завжди не більше одиниці, що значно полегшує порівняння отриманих результатів.

Згрупувавши острівні системи за числом видів в угрупованнях і проаналізувавши відмінності у значеннях індексу відносної вирівненості, ми одержали такі типи структури угруповань.

2.1. Угруповання птахів, що складаються із двох-трьох видів (о-в Китай, Строганівські о-ви, о-в Куюк-Тук, о-ви у Придорожнього).

У ряді випадків, відмінності у значеннях індексу не визначаються розмірами територій, тобто розміри острова не обумовлюють різноманіття придатних для гніздування біотопів. Так, при однаковому числі видів, орнітокомплекс острова Китай має більше значення відносної вирівненості, ніж орнітокомплекс Строганівських о-вів, о-вів у Придорожнього та о-ву Куюк-Тук; це визначається наявністю відповідних умов для видів-домінантів, здатних обмежувати чисельність інших видів, а також різноманітністю гніздових біотопів та ступенем впливу антропогенних чинників (острови, орнітокомплекси яких відрізняються меншими значеннями вирівненості, знаходяться більше до районів господарської діяльності людини).

2.2. Угруповання птахів, що складаються із чотирьох-п'яти видів (о-ви Картазакські, о-ви Генічеські, о-ви Солепрому, о-ви коси Тюп-Тархан, о-ви Першокостянтинівські, о-ви у Єрмаково, о-ви у Заозерному, о-в Танін, о-в Чурюк).

Якщо високі значення індексу вирівненості для о-вів Солепрому, о-ву Чурюк, Першокостянтинівських о-вів, Картазакських о-вів, о-вів у Заозерного і низькі значення для о-ву Танін і о-вів коси Тюп-Тархан пояснюються відповідними

відмінностями площ островів і різноманітністю гніздових біотопів, то високе значення індексу орнітокомплексів Генічеських о-вів і низьке - о-вів у Єрмаково не визначаються розмірами островів, а обумовлюються комплексом причин, в числі яких різна ступінь антропогенного впливу, характер острівної рослинності, віддаленість кормових біотопів.

2.3. Угруповання птахів, що складаються з шести-семи видів (о-ви Зміїні, о-ви Каржинські, о-ви Каланчацькі, о-ви озера Карлеутське, о-ви у Сивашівці, о-в Верблюдка).

Високі значення індексу орнітокомплексів о-вів Зміїних, о-вів озера Карлеутське, о-вів у Сивашовки і о-ви Верблюдка визначаються великими площами островів; о-ви Каланчацькі характеризуються низькою різноманітністю гніздових біотопів і невеликим значенням вирівненості при порівняно великій площі островів, о-ви Каржинські при невеликій площі відрізняються високим показником вирівненості за рахунок різноманітності гніздових біотопів - очертяних асоціацій і різноманітності голінастіх.

2.4. Острівні орнітокомплекси, що складаються з 8-9 видів (о-ви Обитічної затоки, о-ви Полігонні, о-ви Сальково, о-ви озера Айгульське).

Високі значення для орнітокомплексів о-вів озера Агульське, Обитічних о-вів і низьке значення для о-вів Сальково обумовлені розмірами островів; високе значення для полігону о-вів визначається різноманітністю гніздових біотопів і характером рослинності при відносно невеликій площі островів.

2.5. Острівні орнітокомплекси з числом видів більше 10 (о-ви Молочного лиману, система о-вів Коянли).

Всі орнітокомплекси характеризуються середніми значеннями індексу вирівненості, що, при великих площах з одного боку і різноманітності гніздових біотопів з іншого боку, обумовлюється збільшенням територіальної конкуренції та ускладненням орнітокомплексів.

При прийнятій в сучасній екологічній літературі ідеальній вирівненості 80% і більше [2, 28], островними системами з найвищими показниками вирівненості в орнітокомплексах для даного регіону повинні вважатися о-в Китай, о-в Чурюк, о-ви у Заозерного, о-ви у Сивашовки, Першокостянтінівські о-ви, пів-в Верблюдка.

Максимальне значення видів птахів, що гніздяться, для островних орнітокомплексів, які характеризуються значеннями вирівненості вище середніх - не більше дев'яти. При збільшенні числа видів значення вирівненості островних орнітокомплексів знижується, ймовірно, в силу ускладнення конкурентно-територіальних взаємин. Можливо, що для орнітокомплексів з високими значеннями відносної вирівненості допустимі спалахи чисельності домінуючої групи видів при наявності гніздових біотопів.

У меншій мірі це відноситься до орнітокомплексів з низькими значеннями даного індексу.

Ймовірно, що для подальшого управління та розробки заходів щодо охорони біотопів та колоніальних птахів, більш вагоме значення будуть мати островні

системи з низькими значеннями відносної вирівненості орнітокомплексів, розподіл видів за чисельністю в яких визначається домінуючою групою птахів.

У ході аналізу орнітокомплексів за значенням даного індексу були отримані наступні висновки: значення індексу не пов'язано з показником видової різноманітності, що свідчить про те, що в даних умовах видове багатство і вирівненість видів є незалежними компонентами видової різноманітності.

Значення індексу зменшуються при числі видів рівному дев'яти і більше, що пояснюється ускладненням територіально-конкурентних відносин, беручи до уваги обмеженість розмірів островів і наявність придатних для гніздування біотопів.

Індекс Сімпсона надає звичайним видам більшу вагу (при зведенні в квадрат малих значень відносної значущості виходять дуже малі величини). Оскільки значення індексу розташовуються в діапазоні від 0 до 1, це значно полегшує проведення порівняльного аналізу за ступенем домінування. Це дає можливість обговорювати ступінь толерантності видів-домінантів до інших видів орнітокомплексів.

В табл. 1 подано значення індексу екологічного домінування для островів угруповань птахів.

Проаналізувавши значення індексів концентрації домінування, був отриманий висновок про зменшення ступеня впливу видів-домінантів в орнітокомплексах із загальним числом видів більше 6.

Для більшості островів систем визначено високий рівень антропогенного впливу та факторів середовища, переважно гідрологічних.

Острівні системи з орнітокомплексами з найбільш високим рівнем домінування, в даних умовах характеризуються більш низькою різноманітністю гніздових біотопів (визначених складом рослинності, її мозаїчністю, висотою і площею проективного покриття).

Острівні орнітокомплекси з низькими і середніми значеннями концентрації домінування характеризуються більш пізньою стадією розвитку, тобто існують протягом більш тривалого часового періоду.

У цьому зв'язку можна припустити, що, в ідеалі, островні орнітокомплекси (при стабільному рівні антропогенного впливу і відсутності різких змін дії обмежуючих факторів) прагнуть до більш низької концентрації домінування і, враховуючи наявність негативної кореляції, до більш високого рівня відносної вирівненості. Це підтверджується на прикладі Чонгарських островів, островів Полігонної коси, островів Обійтічної затоки, островів Молочного лиману, островів Коянли.

Відстань від материка і наявність охоронного режиму також визначають зменшення значення концентрації домінування (острів Китай, острови коси Обійтічна, острови Молочного лиману).

Для подальшого управління та охорони островів систем слід врахувати, що орнітокомплекси з високими значеннями концентрації домінування, при зниженні (в силу різкого посилення дії обмежуючих факторів) чисельності видів-домінантів, володіють потенціалом для зайняття звільнених екологічних ніш видами, що мають більш низьку значимість, або видами, якісно новими для даної островної системи.

Таблиця 1

Концентрація домінування в острівних угрупованнях птахів.

Домінуючі види (група видів)	Число видів птахів в угрупованнях	Значення індексу
<i>larus genei</i>	4	0,98
<i>larus cachinnans</i>	2	0,96
<i>himantopus himantopus</i>	2	0,85
	4	0,92
<i>sterna hirundo</i>	5	0,87
	7	0,73
<i>gelochelidon nilotica</i>	7	0,85
<i>larus cacinnans+larus genei</i>	4	0,42
<i>sterna sandvicensis+sterna caspia</i>	4	0,42
<i>larus genei+himantopus himantopus</i>	4	0,38
<i>recurvirostra avocetta+himantopus himantopus</i>	9	0,25
	5	0,24
<i>recurvirostra avocetta+gelochelidon nilotica</i>	7	0,26
<i>larus cachinnans+phalacrocorax carbo</i>	6	0,46
	10	0,49
<i>sterna sandvicensis+sterna hirundo</i>	13	0,42
	17	0,43
<i>larus genei+recurvirostra avocetta</i>	6	0,41
	6	0,47
<i>larus cachinnans+recurvirostra avocetta</i>	4	0,60
<i>larus cachinnans+sterna hirundo</i>	6	0,23
<i>larus melanocephalus+larus genei+phalacrocorax carbo</i>	15	0,33
<i>larus genei+gelochelidon nilotica+larus cachinnans</i>	8	0,58
<i>sterna hirundo+larus cachinnans+phalacrocorax carbo</i>	13	0,27
<i>phalacrocorax carbo+sterna caspia+larus cachinnans</i>	9	0,39
<i>sterna sandvicensis+larus cachinnans+phalacrocorax carbo</i>	9	0,31
<i>larus genei+larus melanocephalus+larus cachinnans</i>	9	0,38

Острівні системи, що характеризуються найбільш високими значеннями концентрації домінування - Строгановські острови, острів Куюк-Тук, острови біля Придорожнього, острів Танін, острови Каланчацькі, острови біля Єрмаково.

В цілому ж, в ході аналізу були отримані висновки, що відмінності в просторовій структурі орнітокомплексів можуть визначатися кількістю домінуючих за чисельністю видів та їх значимістю в угрупованнях.

В умовах острівних систем, коли площи, придатні для гніздування, обмежені, і територіальна конкуренція загострюється, види-домінанти можуть визначати видову різноманітність островів. Основні відмінності визначаються площами островів і різноманітністю гніздових біотопів.

Для з'ясування характеру залежностей між обговорюваними раніше показниками був проведений кореляційний аналіз, який статистично підтверджив деякі припущення, висловлені раніше.

Обернена кореляція між відносною вирівненістю та концентрацією домінування підтвердила наявність зворотного зв'язку між домінуванням одного виду або групи видів та успіхом гніздування інших видів угруповання (див. рис. 1).

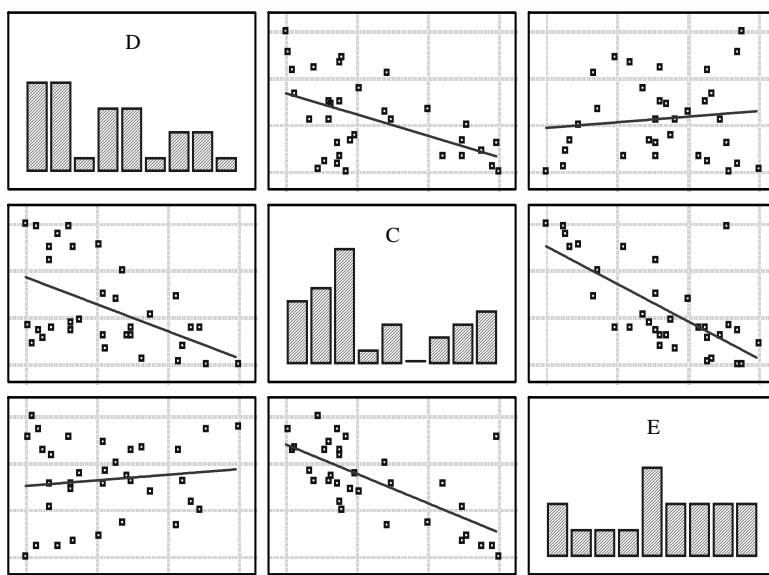


Рис. 1. Регресійні залежності індексів видового різноманіття

Регресійні рівняння: $D = 0,789E - 0,116D$ ($r=-0,507$); $E = 0,504C + 0,296D$ ($r=0,119$); $C = 0,901D - 0,648E$ ($r=-0,703$), $p < 0,05$.

Для з'ясування характеру залежностей між показниками різноманіття був проведений кореляційний аналіз, який статистично підтверджив наші припущення. Результати аналізу наведено в табл. 2.

Таблиця 2

Кореляції між індексами видового різноманіття

Індекс	D	C	E
D	-	0,71**	0,17
C	-0,50**	-	-0,53**
E	0,09	-0,69**	-

Примітки. Значення коефіцієнтів кореляції наведено за Спірманом. Достовірність: ** p<0,05.

На підставі мультиваріантного регресійного аналізу була створена модель відносної вирівненості острівних угруповань птахів, що відображає залежності між значенням відносної вирівненості, видового різноманіття і концентрації домінування (рис. 2).

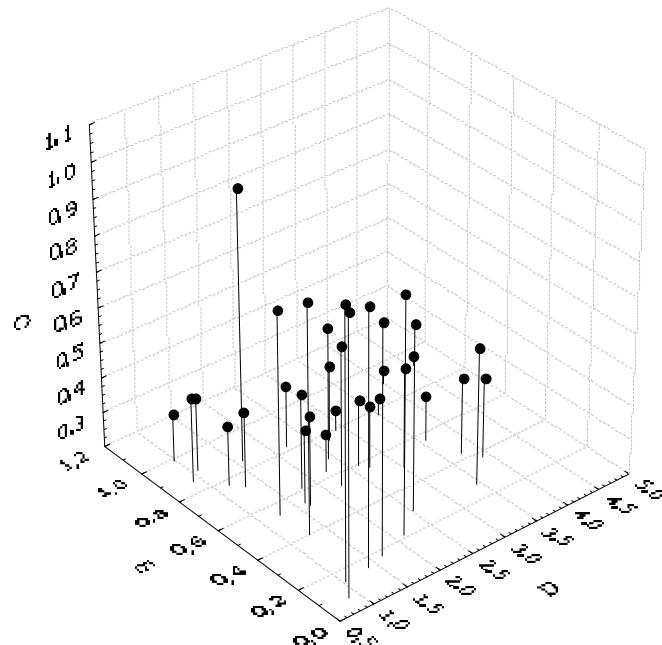


Рис. 2. Модель відносної вирівненості.

Регресійне рівняння моделі: $E = 1,198 - 0,063D - 0,989C$, $p < 0,05$,

де E - значення відносної вирівненості; C - значення концентрації домінування; D - індекс видового різноманіття.

Значення коефіцієнта детермінації ($RI = 0,75$) показує, що отримана регресія пояснює 75 % розподілу значень відносної вирівненості навколо середнього. Одержанна модель визначає максимальне значення відносної вирівненості в острівних угрупованнях птахів при середніх значеннях концентрації домінування та індексах видового різноманіття в інтервалі від 2 до 4.

Для з'ясування залежності значення відносної вирівненості від загальної чисельності птахів і числа видів в угрупованні був проведений множинний регресійний аналіз (рис. 3).

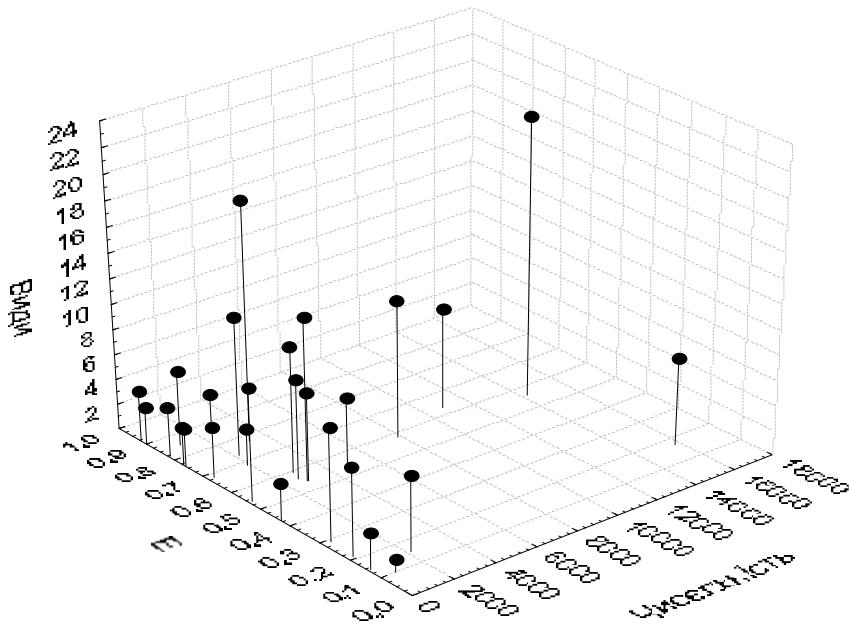


Рис. 3. Залежність значення індексу відносної вирівненості від чисельності птахів і числа видів угруповання

$$E = 0,551 - 0,155E^{-4}(\text{чисельність птахів}) + 0,009(\text{кількість видів}).$$

ВИСНОВОК

Проаналізувавши значення індексів концентрації домінування, було виявлено поступове зменшення впливу видів-домінантів в угрупованнях птахів із збільшенням загального числа видів. Острівні угруповання птахів, що відрізняються найбільш високим рівнем домінування, у даних умовах характеризуються низькою різноманітністю гніздових біотопів (визначеніх складом рослинності, її висотою, мозаїчністю і площею проективного покриття). Острівні угруповання птахів із низькими і середніми значеннями концентрації домінування характеризуються більш пізньою стадією свого розвитку, тобто існують упродовж тривалішого періоду.

У зв'язку із цим можна припустити, що в ідеалі острівні угруповання птахів (при низькому рівні антропогенного впливу і стабільній дії зовнішніх чинників) прагнуть до низької концентрації домінування і, ураховуючи наявність зворотної кореляції, до високих значень відносної вирівненості. Угруповання птахів з високими значеннями концентрації домінування при зниженні чисельності видів-домінантів мають потенціал для зайняття звільнених екологічних ніш видами, що зараз характеризуються низькою значущістю, або видами, якісно новими для даної

острівної системи. Віддаленість від материка та наявність охоронного режиму також визначають низькі значення концентрації домінування.

Відмінності в просторовій структурі угруповань птахів визначаються кількістю домінуючих за чисельністю видів та їх значущістю в угрупованнях. Таким чином, в умовах острівних систем, коли площи, придатні для гніздування, обмежені, а територіальна конкуренція збільшується, види-домінанти визначають видове різноманіття угруповань птахів.

У даних умовах найбільшими значеннями відносної вирівненості характеризуються орнітокомплекси з загальною чисельністю 6000-12000 гніздових пар птахів і числом видів від 6 до 8 чи більше 20.

Результати дослідження, висновки та рекомендації, представлені в роботі, отримали подальший розвиток і були впроваджені в такі документи: "Пропозиція по розширенню території Азово-Сиваського національного парку" (Азово-Сиваський національний природний парк, Азово-Чорноморська орнітологічна станція, Міжвідомча комплексна лабораторія наукових основ заповідної справи), "Пропозиція щодо створення національного природного парку Сиваський", які узгоджені Головним управлінням національних природних парків і заповідної справи відповідно до Закону України "Про Природно-Заповідний фонд України".

Список літератури

1. Fager E.W. Diversity: a sampling study / E.W. Fager // Am Nat. – 1972. – Vol. 106. – P. 293-310.
2. Whittaker R.H. Evolution and measurement of species diversity / R.H. Whittaker // Tarpon. – 1972. – Vol. 21. – P. 213-251.
3. James F.C. Methodological issues in the estimation of trends in bird populations with an example: the pine warbler // Distribution, monitoring and ecological aspects of birds. / F.C. James, C.E. Mc Culloch–Voorburg: Heerlen and Sovon, 1994. – 75 p.
4. O'Connor R.J. Current thinking of United Kingdom bird monitoring / R.J. O'Connor // Survey designs and statistical methods for the estimation of avian populations trends. – Washington: U.S. Fish and Wildlife service, 1990. – P. 24-30.
5. Pielou E.C. Ecological Diversity / E.C. Pielou. – New York: John Wiley, 1975. – P. 50–56.
6. Shannon C.E. The Mathematical Theory of Communication / C.E. Shannon, W. Weaver. – Urbana: University of Illinois Press, 1949. – 117 p.
7. Программа мониторинга околоводных птиц Азово-Черноморского региона Украины / [Черничко И.И., Сиохин В.Д., Попенко В.М. и др.] – Мелитополь: Бранта, 1998. – 81 с.
8. Bourski O.V. Breeding bird dynamics in the Yenisei middle taiga: a 13-year study / O.V. Bourski // Proc.of the 12th International Conference of IBCC and EOAC. – Voorburg (The Netherlands). – 1995. – P. 143-149.
9. Сиохин В.Д. Сравнительная характеристика островных орнитокомплексов побережья Азовского моря и Сиваша / В.Д. Сиохин, А.В. Мацюра // Материалы Всесоюзного научно-методического совещания зоологов педвузов. – Махачкала: Наука. – Часть 2. – 1990. – С. 220-221.
10. Bibby J. Collins, Burgess D. Neil. Bird Census Techniques. / J. Bibby – London: Academic Press, 1992. – P. 153-178.
11. Margalef R. Perspectives of ecological theory / Margalef R. – Chicago; London: Univ. Chicago Press, 1969. – 111 p.
12. Simpson E.H. Measurement of Diversity / E.H. Simpson // Nature. – 1949. – Vol. 163. – P. 688.
13. Мазинг В.П. Консорции как элементы функциональной структуры биоценозов // Труды МОИП. – 1966. – Т. 27. – С. 117-126.
14. Программа и методика биогеоценологических исследований / под ред. Н.В. Дыліса. – М.: Наука, 1974. – С. 14- 23.

15. Колониальные гидрофильные птицы юга Украины. Ржанкообразные / [В.Д. Сиохин, И.И. Черничко, Т.Б. Ардамацкая и др.]. – К.: Наук. думка, 1988. – 174 с.
16. Мацюра А.В. Опыт прогнозирования численности чегравы, гнездящейся на островах Сиваша / А.В. Мацюра // Питання біоіндикації та екології – 2000. – Вип. 5, №2. – С. 129-138.
17. Мацюра А.В. Комплексная оценка динамики численности гнездящихся сообществ колониальных околоводных птиц в условиях некоторых островов Сиваша, Северного Приазовья и Черного моря / А.В. Мацюра // Питання біоіндикації та екології. – 2003. – Вип. 8, № 2. – С. 95-112.
18. Сиохин В.Д. Сравнительная характеристика островных орнитокомплексов побережья Азовского моря и Сиваша / В.Д. Сиохин, А.В. Мацюра // Материалы Всесоюзного научно-методического совещания зоологов педвузов. – Махачкала: Наука. - Часть 2. – 1990. – С. 220-221.
19. Мацюра А.В. К вопросу об измерении устойчивости как количественной характеристики орнитокомплексов / А.В. Мацюра // Бранта: сб. науч. тр. Азово-Черноморской орнитол. станции. – 1998. – Вып. №1. С. 19-23.
20. Мацюра А.В. Опыт выделения консортивных связей сообществ гнездящихся колониальных птиц островов Сиваша / А.В. Мацюра, М.Н. Василенко // Вісник Запор. держ. ун.: Зб. наук. ст. Біологічні науки. – 2004. – № 1. – С. 143-145.
21. Мацюра А.В. Взаимодействия между чайкой-хохотуньей (*Larus cachinnans*), черноголовым хохотуном (*Larus ichthyeatus*) и большим бакланом (*Phalacrocorax carbo*), гнездящимися на острове Китай (Центральный Сиваш) / А.В. Мацюра // Вестник зоологии. - Т. 14: Зоологические исследования на Украине. – Ч. 2: Экология, морфология и методика. – К., 2000. – С. 74-78.
22. Мацюра А.В. Зависимость распределения колониальных птиц от характера растительного покрова на островах Сиваша и побережья Азовского моря / А.В. Мацюра // Материалы Международной научной конференции, посвященной 100 летию заповедания Асканийских степей. - Киев: Киевское книжное издательство научной книги. – 1998. – С. 292-294.
23. Мацюра А.В. Параметры островов, определяющих распределение и значимость колониально гнездящихся птиц на Сиваше / А.В. Мацюра // Питання біоіндикації та екології. – 2002. – Вип. 7, № 2-3. – С. 223-236.
24. Мацюра А.В. Анализ факторов, определяющих пространственное распределение колониально гнездящихся околоводных птиц островных систем Азово-Черноморского региона Украины / А.В. Мацюра // Вестник зоологии. – 2003. – Т. 37, № 5. – С. 53–60.
25. Международные критерии выделения территорий важных для сохранения видового разнообразия птиц в Украине / Украинское общество охраны птиц. – Киев, 1994. – С. 20-22.
26. Микитюк А.В. IBA программа. Методические рекомендации по организации учета птиц. - К.: УООП, 1997. – 31 с.
27. Underhill I.G. Index numbers for waterbird populations: review and methodology / I.G. Underhill, R.P. Prys-Jones // J. Appl. Ecol. – 1994. – Vol. 31. – P. 463-480.
28. Руководящие принципы исследований по странам в области биологического разнообразия. – Найроби: ООН, 1994. – 152 с.

Мацюра А.В. Структура видового разнообразия островных сообществ птиц Сиваша / А.В. Мацюра, М.В. Мацюра // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2012. – Т. 25 (64), № 3. – С.115-128.

Выполнен анализ островных сообществ птиц с использованием основных экологических параметров – индекса видового разнообразия, значения концентрации доминирования и индекса относительной выравненности. Это позволило выявить различия в структуре сообществ, обусловленные их качественным и количественным составом. Различия в пространственной структуре островных сообществ птиц определяются количеством доминирующих по численности видов и их значимостью в сообществах. В условиях островных систем, когда площади, пригодные для гнездования, ограничены, а территориальная конкуренция увеличивается, виды-доминанты определяют видовое разнообразие сообществ птиц.

Ключевые слова: острова, сообщества птиц, видовое разнообразие, доминирование, выравненность.

Matsyura O.V. The structure of the species diversity of island bird communities of Sivash area / O.V. Matsyura, M.V. Matsyura // Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No. 3. – P. 115-128.

The analysis of the island birds' communities was performed using the key ecological parameters - the index of species diversity, dominance, and evenness. This revealed the differences in communities structure due to their qualitative and quantitative composition. The differences in the spatial structure of island bird communities were determined by the number of dominant species and their significance within the communities. In island systems, where the area suitable for nesting are limited, and territorial competition increases, the dominant species determine the species diversity of bird communities at large extend.

Keywords: islands, bird communities, species diversity, dominance, evenness.

Поступила в редакцию 21.09.2012 г.

УДК 633.1:631.5

МЕТАБОЛІЗМ ПІНОКСАДЕНУ В РОСЛИНАХ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ

Михальська Л.М.¹, Швартау В.В.¹, Омельчук С.Т.²

¹*Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, Київ, Україна*

²*Інститут гігієни та екології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, Київ, Україна*

E-mail: Mykhalskaya_L@ukr.net

Встановлено, що застосування грамініциду Аксіал 045 ЕС к.е. у композиціях із протидводольним гербіцидом Дербі 175 SC с.к. та карбамідом посходово не приводить до підвищення залишкових кількостей основних метаболітів піноксадену М02, М04, М06 та М10 у зерні озимої пшениці.

Ключові слова: метаболізм, гербіциди, грамініциди, бур'яни, озима пшениця.

ВСТУП

Грамініциди – протиоднодольні посходові гербіциди широко використовуються у сучасному рослинництві. До грамініцидів відносяться три різних за хімічною природою класи гербіцидів – похідні арилоксифеноксипропіонової кислоти (АОФПК), похідні циклогексан-1,3-діонів або циклогексеноксимів (ЦГД) та фенілпіразоли. Вони є селективними інгібіторами ацетил-КоА-карбоксилази (АКК) злакових рослин і разом складають приблизно 15 % сучасного світового ринку гербіцидів. Гербіциди цих класів застосовуються для післясходової обробки посівів дводольних та однодольних культур з метою селективного знешкодження однорічних та багаторічних злакових бур'янів [1-4].

Вперше синтез амідних похідних фенілпіразолового ряду здійснено на початку 70-х років. Процес появи нових протизлакових гербіцидів продовжує розвиватися з високою інтенсивністю. Відомо чотири гербіциди цього класу: флуазолат, ніпіраклофен, пірафлуфен та піноксаден [5-8].

Боротьба зі злаковими видами бур'янів у посівах озимої пшениці є надзвичайно актуальною у зв'язку із домінуванням зернових колосових у сівозмінах в усіх ґрунтово-кліматичних зонах України та більшості інших зерновиробників світу. Тому знаходження фітотоксичності у сполуки класу фенілпіразолів та реєстрація у провідних країнах світу Аксіалу 045 ЕС к.е. (діюча речовина піноксаден, 45 г/л, та антидот клоквінтоцет-мексил) була наслідком цілеспрямованих багаторічних досліджень з підвищення активності та селективності грамініцидів для пшениці.

Аксіал 045 ЕС к.е. – системний гербіцид, що проникає у рослину крізь листки та транспортується базипетально і акропетально. Інгібітор ацетил-КоА-карбоксилази. Застосовують проти однорічних злакових бур'янів після сходів на посівах озимої пшениці у фазі від початку кущіння культури до фази трубкування включно. Застосовувати гербіцид слід по активно вегетуючих бур'янах в інтервалі

температур від +10°C до +28°C при нормі витрат 1,0 л/га. Препарат найкраще діє на бур'яни на ранніх стадіях розвитку, але може контролювати і бур'яни у генеративній фазі розвитку. Ріст бур'янів припиняється через 48 годин після обробки. Рослини стають хлоротичними, повна загибель спостерігається протягом 1-3 тижнів, залежно від фази розвитку знищуваних рослин та погодних умов. Дія препарату візуально проявляється через 3-15 діб після застосування, в залежності від погодних умов та виду бур'янів. Суттєвим недоліком грамініцидів-інгібіторів ацетил-КоА-карбоксилази є складність досягнення високої фітотоксичності та селективності у робочих сумішах з іншими пестицидами, наприклад, препаратами класів антиауксинів (похідні 2,4-Д, бензойної кислоти та інші), інгібіторів моноксигеназ (фосфорорганічні інсектициди) тощо.

Зазначимо, що піноксаден доцільно застосовувати переважно у сумішах із протидводольними препаратами, а також із добривами для позакореневого підживлення [1-4]. Визначено перспективність застосування Аксіалу у композиції з протидводольним гербіцидом Дербі 175 SC с.к. (100 г/л флуметсуаламу + 75 г/л флорасуаламу) компанії «Сингента» (Швейцарія) та карбамідом [1, 4].

Метаболізм піноксадену в рослинах досліджували на посівах пшениці і ячменю у Франції, Німеччині, Італії, Іспанії, Австралії та США [9-14]. Були описані аналітичні методи для визначення вмісту метаболітів піноксадену, вільного та зв'язаного SYN 505164 (M04) і NOA 407854 (M02) у воді, ґрунті та рослинах. Методи базуються на гомогенізації зразків в 1М HCl із зворотним холодильником протягом кількох годин із наступною екстракцією залишку аналітів з використанням суміші органічних екстрагентів, наприклад екстрагенту дихлорметан/діетиловий ефір/ацетон (40:7:3). Екстракти очищаються на спеціальних селективних юнообмінних картриджах, і рівні вільного і зв'язаного SYN 505164 (метаболіт M04) визначаються з використанням ВЕРХ з УФ-детекцією при 223 нм. Рівні NOA 407854 (метаболіт M02) визначаються за допомогою ВЕРХ системи з УФ-детекцією при 243 нм.

В рослинах переважна кількість піноксадену зникає досить швидко після внесення. Натомість з'являються його метаболіти M02, M04, M06 та M10. Так, у Франції на 67 день досліджень кількість метаболітів в зерні озимої пшениці складала, відповідно, M02 < 0,01 мг/кг, M04 – 0,05-0,06 мг/кг, M06 – 0,01 мг/кг, M10 < 0,01 мг/кг. В Італії на 68 день досліджень – M04 – 0,09 мг/кг, M06 – 0,01 мг/кг, M02 < 0,01 мг/кг, M10 < 0,01 мг/кг. В Іспанії на 73 день досліджень – M04 – 0,1-0,11 мг/кг, M06 – 0,03 мг/кг, M02 < 0,01 мг/кг, M10 < 0,01 мг/кг. В Німеччині на 85 день досліджень залишкові кількості усіх метаболітів складали менше 0,01 мг/кг. Дослідження на посівах ячменю ярого і озимого, проведені у вищезгаданих країнах, дозволили виявити наступні середні показники вмісту метаболітів піноксадену: в ячмені ярому – M02 < 0,01 мг/кг, M04 – 0,02-0,13 мг/кг, M06 – 0,01-0,04 мг/кг, M10 < 0,02-0,01 мг/кг; в ячмені озимому – M02 < 0,01 мг/кг, M04 – 0,02-0,06 мг/кг, M06 – 0,01 мг/кг, M10 < 0,01 мг/кг. З представлених даних можна зробити висновок про відносно незначну стабільність препарату та його метаболітів у посівах зернових колосових культур різних агрокліматичних зон [15].

МЕТАБОЛІЗМ ПІНОКСАДЕНУ В РОСЛИНАХ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ

При цьому, вплив компонентів робочих розчинів за сумісного застосування піноксадену з протидводольними гербіцидами та добривами на метаболізм грамініциду не встановлений.

Тому, метою роботи було визначити вплив гербіциду Дербі 175 SC с.к. та карбаміду на метаболізм піноксадену у рослинах озимої пшениці та бур'янів на прикладі метлюгу звичайного.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Дослідження проводили на виробничих посівах озимої пшениці (*Triticum aestivum L.*) сорту Смуглнянка у Вінницькій області (АФ «Комора», смт. Тростянець, ПрАТ «Зернопродукт МХП») та Дослідного сільськогосподарського виробництва Інституту фізіології рослин і генетики НАН України у смт. Глеваха Васильківського району Київської області у 2008-2012 рр. Облікові ділянки в досліді займали площу 10 м², повторність 6-10 кратна.

У зоні дослідження за вегетаційний період сума активних температур (понад +10 °C) становила близько 2600–2900 °C. Опадів протягом року випадало від 460 до 520 мм, а за літній період у середньому 200-220 мм. Вегетаційні сезони 2010-2011 років відрізнялися тривалими високими температурами та сильною посухою у генеративну фазу розвитку пшениці. Влітку температура піднімалася до 42 °C. Середня місячна температура повітря у травні 2012 року становила 13-16 °C, місячна кількість опадів становила 40-60 мм, що свідчить про те, що погодні умови були сприятливими для формування врожаю зернових.

Протягом вегетації проводили підживлення рослин, боротьбу зі шкідниками та хворобами і фенологічні спостереження. Насіння обробляли перед посівом протруйником Селест Топ 312,5 FS т.к.с. (1,5 л/т). До робочого розчину додавали комплексні добрива на основі монокалійфосфату (2 кг/т насіння). Протягом вегетації обробляли рослини фунгіцидами Альто Супер 330 ЕС к.е. (0,5 л/га) і Амістар Екстра 280 SC к.с. (0,7 л/га), інсектицидом Енжіо 247 SC к.с. (0,2 л/га), зокрема у фазу кущіння, цвітіння та по прaporцевому листку. Гербіцидами Дербі 175 SC с.к. (0,070 л/га) і Аксіал 045 ЕС к.е. (1,0 л/га) у фазу виходу в трубку озимої пшениці обробляли основну площину поля, залишаючи ділянки 0,2-0,3 га для проведення досліджень та визначення позакоренової дії препаратів у варіантах: контроль (без внесення гербіцидів та добрив); Дербі 175 SC с.к., 0,070 л/га; Аксіал 045 ЕС к.е., 1,0 л/га; Дербі 175 SC с.к., 0,070 л/га + Аксіал 045 ЕС к.е., 1,0 л/га; Дербі 175 SC с.к., 0,070 л/га + Аксіал 045 ЕС к.е., 1,0 л/га + карбамід, 10 кг/га туків. Обприскування проводили у вечірні години, за температури повітря 20-24 °C та за відсутності вітру.

Визначення вмісту піноксадену та його метаболітів (табл. 1) проводили методом ВЕРХ [12-14].

Таблиця 1

Піноксаден та його метаболіти

Сполука	Структурна формула	Назва за IUPAC
Піноксаден M01 (NOA 407855)		8-(2,6-діетил- <i>p</i> -толіл)-1,2,4,5-тетрагідро-7-оксо-7 <i>H</i> -піразоло[1,2- <i>d</i>][1,4,5]оксадіазепін-9-іл 2,2-диметилпропіонат
Метаболіт M02 (NOA 407854)		8-(2,6-діетил-4-метил-феніл)-тетрагідропіразоло-[1,2-d]-[1,4,5]-оксадіазепін-7,9-діон
Метаболіт M04 SYN 505164		8-(2,6-діетил-4-гідроксиметил-феніл)-тетрагідропіразоло[1,2-d][1,4,5]окса-діазепін-7,9-діон
Метаболіт M06 SYN 502836		4-(7,9-діоксо-гексагідропіразоло[1,2-d][1,4,5]окса-діазепін-8-іл)-3,5-діетил-бензойна кислота
Метаболіт M10 (NOA 447204)		8-(2,6-діетил-4-гідроксиметил-феніл)-тетрагідропіразоло-[1,2-d]-[1,4,5]-окса-діазепін-7,9-діон

МЕТАБОЛІЗМ ПІНОКСАДЕНУ В РОСЛИНАХ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ

Контроль піноксадену та його метаболітів в рослинах озимої пшениці та основного злакового бур'яну у посіві метлюгу звичайного (*Apera spica-venti* L.) і в зерні пшениці здійснювали після екстрагування сумішшю 1 Н соляної кислоти - ацетонітрилу (M02) та 1 Н соляною кислотою (M04, M06, M10) при кип'ятінні, послідовної очистки аліквоти екстракту перерозподілом в системі не змішуваних розчинників на колонці з оксидом алюмінію, потім - концентруючих патронах Oazis(R) HLB (M2) або двічі Oazis(R) MCX (M04, M06, M10) (концентруючі патрони компанії «Waters», США).

Умови хроматографування: рідинний хроматограф “Shimadzu” з УФ-детектором, колонка Нуклеосил C18, рухома фаза – суміш ацетонітрилу та бідистильованої води 70:30, час утримування відповідав стандартам. Метаболіти M02, M04, M06 та M10 компанії «Сингента», Швейцарія.

Результати математично оброблені за допомогою професійного пакету програм для статистичного аналізу Statistica 8,0, згідно стандартних методик та за допомогою програми Exel [16-18].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Показано, що в рослинах пшениці озимої за добу після обробки знайдено низькі рівні піноксадену (МДР в зерні хлібних злаків 0,2 мг/кг). За тиждень після обробки вміст піноксадену був нижчим за рівень чутливості методу.

В рослинах злакового виду бур'яну вміст піноксадену чітко реєструвався із тенденцією до зростання за тиждень після обробки. У більш пізні терміни складність визначення вмісту піноксадену у рослинах *Apera spica-venti* L. визначали прояв фітотоксичності гербіциду та швидке зниження маси сирої речовини рослин бур'яну (табл. 2).

Таблиця 2

Вміст піноксадену в рослинах озимої пшениці та метлюгу звичайного

Доба після обробки	Вміст, мг/кг	
	Пшениця озима	Метлюг звичайний
1	0,07±0,01	0,09±0,01
7	<0,01	0,15±0,03
15	н.в.*	н.в.**

Примітки: * - н.в. – не виявлено, ** - н.в. у зв'язку із повною загибеллю рослин злакового бур'яну. В контрольних зразках піноксадену не виявлено.

Результати дослідження метаболізму Аксіалу 045 ЕС к.е. в рослинах пшениці озимої (табл. 3) свідчать, що піноксаден (M01) є лише другорядним компонентом від загальної кількості залишків вже у фазу прапорцевого листка. Відразу ж після застосування діюча речовина Аксіалу піноксаден (M01) швидко гідролізується до метаболіту M02 (NOA 407854), який є основним метаболітом у рослинах пшениці вже в перші дні після обприскування. M02, в свою чергу, піддається

гідроксилюванню з утворенням M04 (SYN 505164). Метаболіт M04 є основним у рослинах пшениці за 7-14 днів після обприскування. Метаболізм M04 відбувається наступними трьома основними шляхами: (I) сполученням M04 з глюкозою, що приводить до утворення M05, який ряд авторів [9-15] знаходили в усіх пробах пшениці після обприскування; (II) окисненням M04 з утворенням кислотного метаболіту M06 (SYN 502836), частка якого є відносно невеликою серед інших метаболітів (менше 10 %) в більшості випадків відбору та аналізу проб, і (III) гідроксилюванням M04 з наступним утворенням M10 (SYN 505887), який, як відомо [9-15], є другорядним метаболітом в усіх зразках пшениці, крім соломи.

Таблиця 3
Вплив гербіциду Дербі та карбаміду на накопичення піноксадену в рослинах озимої пшениці

Варіант, сполука	Аксіал	Аксіал + Дербі	Аксіал + Дербі + карбамід	Вміст сполуки, мг/кг	
				Фаза прапорцевого листка	Зерно
Піноксаден	+	-	-	<0,01	н.в.
Піноксаден	-	+	-	<0,01	н.в.
Піноксаден	-	-	+	<0,01	н.в.
Метаболіт M2	+	-	-	0,21±0,06	<0,01
Метаболіт M2	-	+	-	0,20±0,04	<0,01
Метаболіт M2	-	-	+	0,29±0,04	<0,01
Метаболіт M4	+	-	-	0,15±0,04	0,03±0,01
Метаболіт M4	-	+	-	0,15±0,03	0,03±0,01
Метаболіт M4	-	-	+	0,19±0,04	0,04±0,01
Метаболіт M6	+	-	-	0,05±0,01	<0,01
Метаболіт M6	-	+	-	0,06±0,01	<0,01
Метаболіт M6	-	-	+	0,06±0,01	<0,01
Метаболіт M10	+	-	-	0,07±0,01	0,02±0,01
Метаболіт M10	-	+	-	0,07±0,01	0,02±0,01
Метаболіт M10	-	-	+	0,09±0,02	0,03±0,01

Встановлено, що додавання протидводольного гербіциду Дербі 175 SC с.к. до розчинів Аксіалу 045 ЕС к.е. не впливає на метаболізм піноксадену. Натомість зазначимо, що за додавання карбаміду та Дербі 175 SC с.к. до розчинів Аксіалу 045 ЕС к.е. спостерігалося дещо вище накопичення метаболіту M02 в рослинах пшениці у фазу прапорцевого листка. Підвищення накопичення метаболіту M04 за внесення карбаміду було статистично недостовірним. У зерні знайдено лише невеликі кількості метаболітів M04 та M10.

За встановленої величини ДДД піноксадену для людини на рівні 0,005 мг/кг м.т. запропонований МДР піноксадену у зерні хлібних злаків – 0,2 мг/кг – при

перевірці його безпечності показав надійність у забезпеченні нешкідливості діючої речовини. Відповідно до фізіологічних норм споживання продуктів із зерна щоденно людина може вживати до 380 г таких виробів, що за умови наявності у зерні хлібних злаків піноксадену на рівні 0,2 мг/кг забезпечить максимальне надходження 0,076 мг піноксадену на добу. Отримані дані свідчать, що з продуктами із зерна хлібних злаків може надійти не більше 10-15 % від можливого надходження і встановлена величина МДР піноксадену у зерні хлібних злаків на рівні 0,2 мг/кг гарантує нешкідливість для людини сільськогосподарської продукції, вирощеної із застосуванням препарату Аксіал 045 ЕС, к.е. [15].

ВИСНОВКИ

Застосування грамініциду Аксіалу 045 ЕС к.е. у сумішах з протидводольним гербіцидом Дербі 175 SC с.к. та карбамідом не приводить до підвищення залишкових кількостей основних метаболітів M04, M06 та M10 піноксадену у зерні озимої пшениці. Встановлено, що дана композиція є безпечною для застосування в рослинництві та з високою ефективністю контролює основні шкодочинні бур'яни на посівах озимої пшениці та ячменю.

Список літератури

1. Швартай В. В. Гербіциди. Основи регуляції фітотоксичності та фізико-хімічні і біологічні властивості / В. В. Швартай. – К. : Логос, 2009. – Т. 2. – 1046 с.
2. Мордерер Є. Ю. Гербіциди. Механізми дії та практика застосування / Є. Ю. Мордерер, Ю. Г. Мережинський. – К. : Логос, 2009. – Т. 1. – 379 с.
3. Моргун В. В. Физиологические основы формирования высокой продуктивности зерновых злаков / В. В. Моргун, В. В. Швартай, Д. А. Киризий // Физиология и биохимия культурных растений. – 2010. – Т. 42, № 5. – С. 371–393.
4. Швартай В. В. Вплив азотних добрив на активність гербіцидів Аксіал та Дербі / В. В. Швартай, Л. М. Михальська // Вісник аграрної науки. – 2012. – № 5. – С. 19–22.
5. Phenylpyrazole amide herbicides / M. W. Moon, L.T. Bell, T. L. Cutting [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 1977. – V. 25 (5). – P. 1039–1049.
6. Pinoxaden – for broad spectrum grass weed management in cereal crops / U. Hofer, M. Muehlebach, S. Hole, A. Zoschke // Journal of Plant Diseases and Protection. – Special Issue XX, Chapter 9. – 2006. – P. 989–995.
7. Pat. 006103667A United States, PCT/EP 96/02417, WO 97/00240. Phenylpyrazole herbicides / H.-G. Brunner, M. Karvas, K. Nebel, G. Pissiotas ; assignee Novartis Corporation, Summit N.J. – № 6.103.667 ; appl. 04.06.96 ; pub. 15.08.00.
8. Kieloch R. Pinoxaden – a new active ingredient for grass weed control in cereals of South / R. Kieloch, K. Domaradzki, J. Gyrniak // West Poland Journal of Plant Diseases and Protection. – 2006. – P. 1067–1072.
9. Raffel H. Axial – influence of the application timing on the reliable control of grass weeds in cereals / H. Raffel, P. Nielsen, W. Ruegg // J. Plant Dis. Protect XX. – Special Issue. – 2006. – P. 1039–1046.
10. Krämer W. Modern Crop Protection Compounds / W. Krämer, U. Schirmer // Wiley-VCH, Weinheim. – 2007. – V. 1. – P. 350–354.
11. Development of a complex-based flow injection spectrophotometric method for determination of the herbicide pinoxaden in environmental samples / J. Shah, M. R. Jan, M. Muhammad, F-N. Shehzad // Toxicological & Environmental Chemistry. – 2011. – V. 93 (8). – P. 1547–1556.
12. Aryldiones incorporating a [1,4,5] oxadiazepane ring. Part 2: Chemistry and biology of the cereal herbicide pinoxaden / M. Muehlebach, F. Cederbaum, D. Cornes [et al.] // Pest. Manag. Sci. – 2011. – V. 67. – P. 1499–1521.

13. Расчетные методы оценки опасности и гигиенического нормирования вредных веществ в разных средах / В. Г. Смирнов, В. Г. Маймолов, С. П. Нечипоренко [и др.]. – СПб. – 2002. – 130 с.
14. Методичні вказівки з визначення мікрокількостей пестицидів у харчових продуктах, кормах та навколошньому середовищі / Розробники: О.М. Коршун, В.В. Шевчук, Д.Б. Гиренко. – Інститут гігієни та екології Національного медичного університету ім.. О.О. Богомольця // Міністерство екології та природних ресурсів України. Департамент Екологічної безпеки. – Наказ № 816-2007 від 11 січня 2008 року. – Зб. № 76. – Офіційне вид. – К., 2011. – С. 134-149.
15. Благая А. В. Гігієнічне обґрутування регламентів безпечного застосування нових пестицидів в інтенсивних технологіях вирощування зернових колосових культур : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук : спец. 14.02.01 «Гігієна та професійна патологія» / А. В. Благая. – К., 2012. – 24 с.
16. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта / Б. А. Доспехов. – М. : АгроХимиздат, 1985. – 351 с.
17. Радов А. С. Практикум по агрохимии / А. С. Радов, И. В. Пустовойт, А. В. Корольков. – М. : Агропромиздат, 1985. – 312 с.
18. Методики випробування і застосування пестицидів / С. О. Трибель, Д. Д. Сігарьов, М. П. Секун, О. О. Іващенко. – К. : Світ, 2001. – 448 с.

Михальская Л.Н. Метаболизм пиноксадена в растениях озимой пшеницы / Л.Н. Михальская, В.В. Швартау, С.Т. Омельчук // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2012. – Т. 25 (64), № 3. – С.129-136.

Установлено, что применение граминицида Аксиал 045 ЕС к.е. в композициях с противодвудольным гербицидом Дерби 175 SC с.к. и карбамидом после всходов не приводит к повышению остаточных количеств основных метаболитов пиноксадена M02, M04, M06 и M10 в зерне озимой пшеницы.

Ключевые слова: метаболизм, гербициды, граминициды, сорняки, озимая пшеница.

Mykhalska L.M. Pinoxaden metabolism in winter wheat / L.M. Mykhalska, V.V. Schwartau, S.T. Omelchuk // Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No. 3. – P. 129-136.

Found that the use of graminicide Axial 045 EC k.e. in compositions with herbicide Derby 175 SC s.c. and urea after germination did not enhance major pinoxaden residual metabolites M02, M04, M06 and M10 in winter wheat grain.

Keywords: metabolism, herbicides, graminicides, weeds, winter wheat.

Поступила в редакцию 26.09.2012 г.

УДК 594.124:577.115:62.-757.7(262.5)

**ЛИПИДНО-УГЛЕВОДОРОДНЫЙ СОСТАВ *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*
(LAMARCK, 1819) ИЗ ОБРАСТАНИЙ ГИДРОТЕХНИЧЕСКИХ СООРУЖЕНИЙ
АРТИЛЛЕРИЙСКОЙ БУХТЫ (СЕВАСТОПОЛЬ, ЧЁРНОЕ МОРЕ)**

Муравьёва И.П., Миронова Т.О.

*ИнБЮМ им. А.О. Ковалевского НАН Украины, Севастополь, Украина
E-mail: imuraveva@mail.ru*

Впервые рассчитано, что мидия размером 30 – 40 мм содержит около 2,0 мг нефтяных углеводородов, размером менее 10 мм около 0,2 мг нефтяных углеводородов. Мидии из наиболее загрязнённых участков бухты отличаются повышенным количеством липидов и углеводородов. Полученные результаты могут быть использованы в мониторинговых исследованиях.

Ключевые слова: мидии, липиды, нефтяные углеводороды, гидротехнические сооружения.

ВВЕДЕНИЕ

Липидно-углеводородный комплекс, являясь составной частью органических веществ, вместе с ними переходит с береговых естественных и искусственных структур в море. Известно, что накопление и воздействие липофильных органических загрязняющих веществ, в том числе и компонентов нефти, на моллюсков зависит от содержания липидов в организме [1]. Нефтяные углеводороды накапливаются в богатых липидами тканях живых организмов, и в этом комплексе могут выходить в морскую воду после гибели гидробионтов [2].

Данная работа является продолжением длительных наблюдений за изменением липидно-углеводородного состава обрастаний гидротехнических сооружений Артиллерийской бухты, характеристика которой была дана ранее [3]. На этом полигоне впервые проведённые исследования химического состава отдельных элементов обрастаний гидротехнических сооружений (микроперифитона и макрофитов), показали, что в наиболее загрязнённых

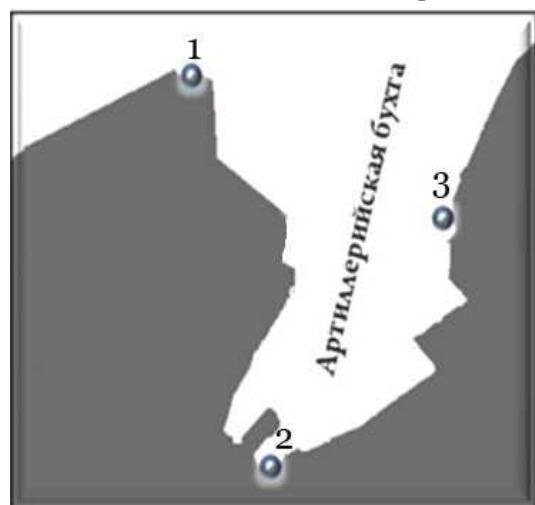


Рис. 1 Схема расположения станций в б. Артиллерийской

участках бухты они отличаются повышенным содержанием липидов и углеводородов [3, 4].

Представляет интерес изучение липидно-углеводородного состава мидий как одного из элементов обрастаний гидротехнических сооружений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пробы отбирали на трёх станциях бухты Артиллерийской (рис. 1), входящей в систему Севастопольских бухт, ручным скребком с вертикальной бетонной стенки набережной в приповерхностном горизонте (0 – 30 см) ежеквартально с лета 2009 г. по зиму 2011 г. В естественных поселениях как правило встречаются особи различных размерных групп. Материалом для исследования служили крупные мидии размером 30 – 40 мм и мелкие мидии длиной менее 10 мм. Мягкие ткани крупных мидий и мелкие мидии со створками предварительно высушивали при температуре 100°C и растирали в ступке до порошкообразного состояния. Для анализа брали навеску (в трёх повторностях) тканей мидий в 10 мг и мидий со створками в 100 мг, поскольку известно, что сухая масса мягких тканей составляет 3,3 – 4,4 % общей сырой массы мидии [5]. Липидно-углеводородный комплекс экстрагировали смесью хлороформ-этанол (2:1). Липиды определяли по цветной реакции с фосфованилиновым реагентом по Агатовой, суммарные углеводороды фракционированием модифицированным методом тонкослойной хроматографии на пластинах «сорб菲尔» и дальнейшим денситометрированием [6]. Нефтяные углеводороды определяли в инфракрасном спектре (длины волн 2700 – 3100^{–см}) на ИК Фурье. Результаты статистически обработаны по критерию Стьюдента ($p = 0,05$), разброс данных представлен стандартным отклонением.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Необходимо отметить, что в отдельных пробах не всегда присутствовали одновременно крупные и мелкие моллюски. Так, например, в 2011 г. весной, летом и осенью в пробах отсутствовали крупные мидии. Содержание липидов в мягких тканях крупных мидий представлено на рис 2.

Как видно из рис. 2 количество липидов в мягких тканях мидий составило в среднем $8,8 \pm 1,1$ мг/ 100 мг сухого веса. Летом и осенью 2009 г. оно колебалось в пределах 7 – 9 мг/100 мг, а на протяжении 2010 г. изменялось от 6 до 11 – 12 мг/100 мг, причем минимальное содержание липидов отмечено зимой, а наибольшее весной и осенью. Увеличение жировых запасов в указанные сезоны может быть обусловлено как жизненным циклом мидий (репродуктивные периоды), так и внешними факторами [5, 7].

Мелкие мидии анализировали вместе со створками, поскольку предварительно проведённые исследования указывают, что створки мидий содержат липидов 0,1 мг/100 мг сухого веса, углеводородов 0,03 мг/100 мг, нефтяных углеводородов 0,02 мг/100 мг.

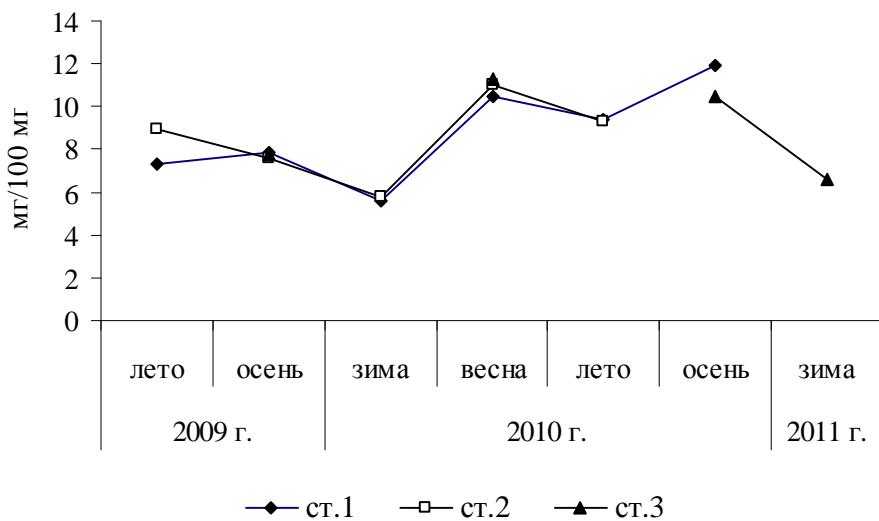


Рис. 2 Содержание липидов в мягких тканях крупных мидий

На рис 3 представлено содержание липидов в мелких мидиях со створками.

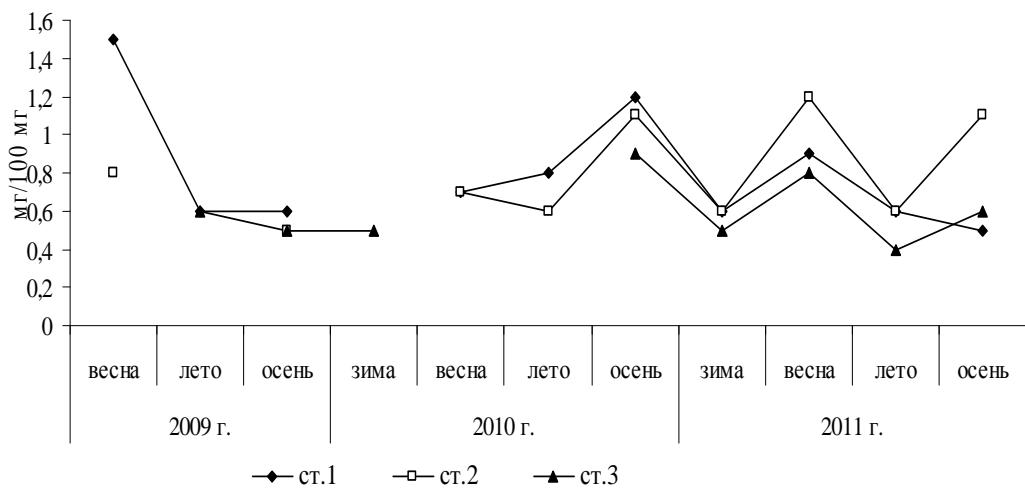


Рис.3 Содержание липидов в мелких мидиях со створками

Количество липидов в среднем в мелких мидиях составило $0,7 \pm 0,1$ мг/100 мг. Максимальная концентрация этих соединений $1,5 \pm 0,07$ мг/100 мг определена на ст.1, минимальная $0,4 \pm 0,01$ мг/100 мг на ст.3. Повышенное содержание липидов отмечено в основном на ст.1 и 2, также в большей степени весной и осенью, как и в тканях крупных мидий.

На рис.4 представлено содержание углеводородов в мягких тканях крупных мидий.

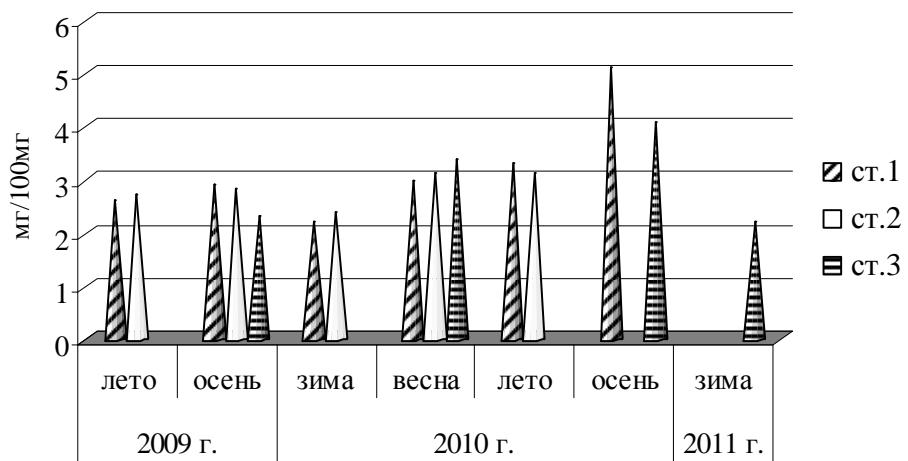


Рис.4. Содержание углеводородов в мягких тканях крупных мидий

В среднем количество углеводородов в мягких тканях мидий составило $3,0 \pm 0,37$ мг/100 мг сухого веса. Максимальная концентрация углеводородов отмечена осенью 2010 г.

На рис.5 представлено содержание углеводородов в мелких мидиях со створками.

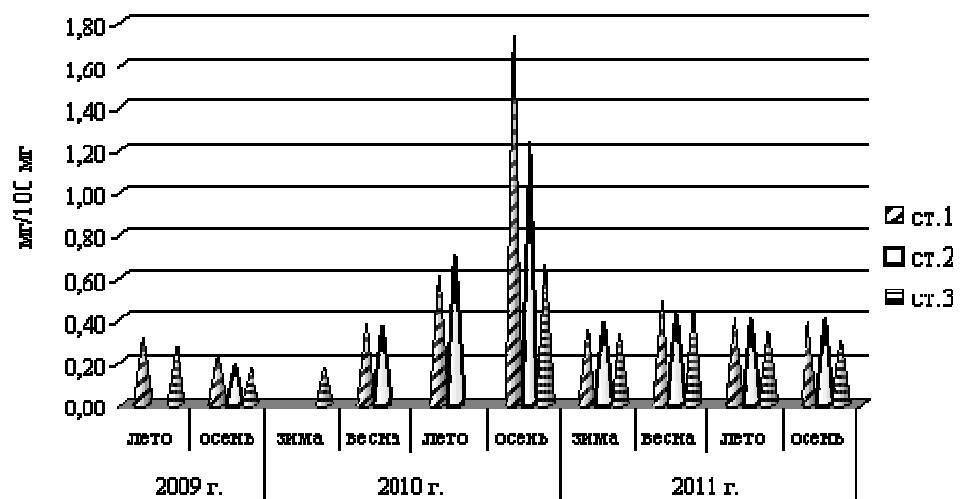


Рис. 5 Содержание углеводородов в мелких мидиях со створками

Содержание углеводородов в среднем колебалось от $0,34 \pm 0,06$ до $0,52 \pm 0,14$ мг/100 мг. Меньшее их количество отмечено на ст.3. Максимальная концентрация углеводородов в мелких мидиях со створками на исследованных станциях наблюдалась осенью 2010 г., соответственно в это же время в них определялось и повышенное содержание липидов.

Характер сезонных изменений углеводородов подобен таковому липидов. Известно, что мидии с высоким содержанием липидов накапливают в себе больше углеводородов, а исследования с мидиями из бухт разной степени загрязнения показали, что моллюски из загрязненной бухты отличаются большим содержанием липидов и углеводородов [8].

На рис. 6 представлено содержание нефтяных углеводородов в мягких тканях крупных мидий.

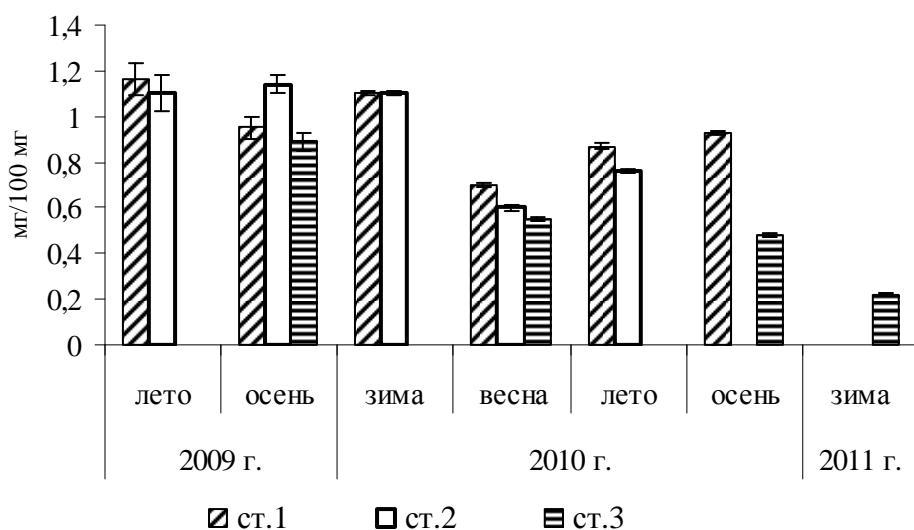


Рис.6 Содержание нефтяных углеводородов в мягких тканях крупных мидий

Среднее количество нефтяных углеводородов на ст.1 и 2 составило $0,95 \pm 0,09$ мг/100 мг сухого веса, тогда как на ст.3 почти в 2 раза меньше. Более высокое содержание нефтяных углеводородов в мягких тканях крупных мидий наблюдалось в 2009 г. Можно отметить, что в это же время повышенное содержание нефтяных углеводородов было определено и водорослях макрофитах из обрастаний гидротехнических сооружений Артиллерийской бухты [3].

Количество углеводородов в мидиях зависит от степени загрязнения морской среды, так, например, известно, что мидии из чистого района акватории Севастополя содержали нефтяных углеводородов 48 мг/100 г сырого веса, а из загрязненной бухты 180 мг/100 г сырого веса [9], что в пересчёте на сухой вес соответствует полученным нами результатам.

На рис.7 представлено содержание нефтяных углеводородов в мелких мидиях со створками.

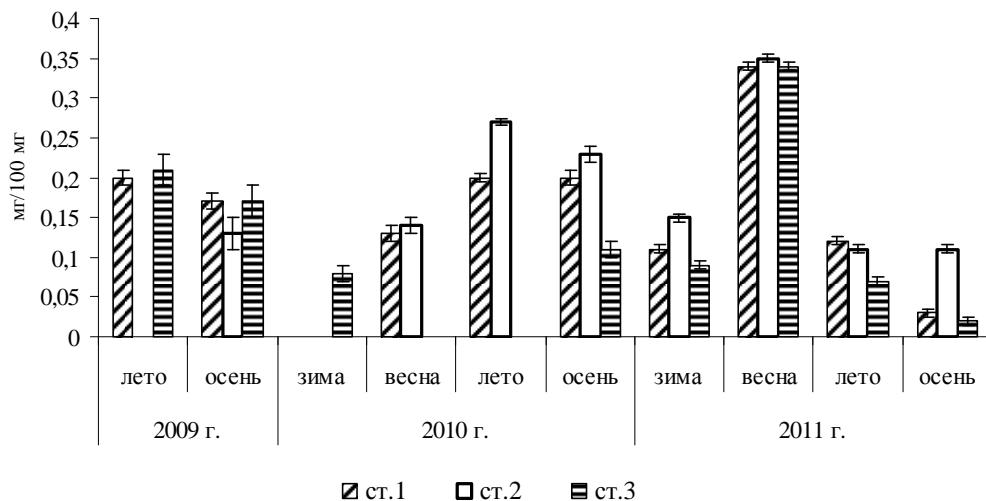


Рис.7. Содержание нефтяных углеводородов в мелких мидиях со створками

Среднее количество нефтяных углеводородов колебалось от $0,14 \pm 0,04$ мг/ 100 мг на ст.3 до $0,19 \pm 0,03$ мг/100 мг на ст.2. Максимальная концентрация была отмечена весной 2011 г. на всех станциях: 0,34 – 0,35 мг/100 мг, что вероятно было связано с залповым выбросом нефтепродуктов в море.

В 2009 г. на долю нефтяных углеводородов в мягких тканях крупных мидий приходилось 40 % от суммы углеводородов, а в мелких мидиях со створками 70 – 90 %, в последующие сезоны их доля в среднем составляла 30 %. Многолетние исследования показали [8], что количество и состав углеводородов мидий отражают содержание в морской воде нефтяных и биогенных углеводородов. В частности, в период массового цветения фитопланктона в теле мидий отмечается преобладание биогенных углеводородов (C_{15} , C_{17}), характерных для углеводородного состава фитопланктона. Спектр углеводородов мидий, собранных из загрязненных нефтью и нефтепродуктами бухт, идентичен нефтяным углеводородам.

По данным Соловьёвой О. В. [10] средняя сухая масса тканей мидии размером 30 – 40 мм составляет 176 мг, расчёты путём получено, что такая мидия содержит около 2,0 мг нефтяных углеводородов, тогда как средняя сухая масса мидии со створками размером < 10 мм составляет 140 мг и такая мидия содержит около 0,2 мг нефтяных углеводородов.

Можно отметить, что меньшее количество нефтяных углеводородов наблюдалось как в тканях крупных мидий, так и в мелких мидиях со створками на ст.3.

Бухта Артиллерийская испытывает значительную антропогенную нагрузку, её донные осадки загрязнены нефтепродуктами [11]. Изученный липидно-углеводородный состав макрофитов и микроперифитона обрастаний

гидротехнических сооружений на указанных станциях показал, что наиболее загрязнённой является ст.2 [3, 4]. Однако по содержанию липидов и углеводородов мягких тканей мидий и мидий со створками она не выделяется. Вероятно это может быть связано с тем, что мидии, как и большинство двустворчатых моллюсков, выработали комплекс адаптаций, позволяющий им выживать в условиях загрязнения нефтью и нефтепродуктами [12], а также с тем, что сравнительно невысокая скорость накопления углеводородов мидиями более загрязнённой бухты может быть связана с насыщением тканей углеводородами, включая те отделы, где растворяются и аккумулируются углеводороды [8].

Как указывают Иванов В.А. и др. [13] на изменение экологических условий, распределение загрязнённых вод в разных частях Севастопольской бухты значительное влияние оказывают интенсивность водообмена, динамика вод и сгонно-нагонные ветры. Морфометрические особенности, полузамкнутость бухты, искусственное сужение входного пролива способствуют при определённых ветровых условиях формированию вихревых динамических структур внутри бухты. Замкнутые циркуляционные ячейки локализуют линзы распределяемых вод, в которых накапливаются загрязняющие вещества. Вероятно этим можно объяснить количественное отличие липидно-углеводородного состава мидий со ст.3.

ВЫВОД

Впервые рассчитано, что мидия размером 30 – 40 мм содержит около 2,0 мг нефтяных углеводородов, размером менее 10 мм около 0,2 мг нефтяных углеводородов. Мидии из наиболее загрязнённых участков бухты отличаются повышенным количеством липидов и углеводородов. Полученные результаты могут быть использованы в мониторинговых исследованиях.

Список литературы

1. Фокина Н.Н. Липидный состав мидий *Mytilus edulis* L. Белого моря. Влияние некоторых факторов среды обитания / Фокина Н.Н., Нефедова З.А., Немоляева Н.Н. – Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2010. – 243 с.
2. Миронов О.Г. Взаимодействие живых организмов с нефтяными углеводородами. – Л.: Гидрометеоиздат, 1985. – 128 с.
3. Муравьёва И.П. Сезонная динамика липидно-углеводородного состава макрофитообрастаний гидротехнических сооружений Артиллерийской бухты (Севастополь, Чёрное море) / Муравьёва И.П., Миронова Т.О. // Учен. записки ТНУ им. В. И. Вернадского. – Серия «Биология и химия». – 2011. – Т. 24 (63), № 4. - С. 166 – 170.
4. Муравьёва И.П. Мониторинговые исследования липидно – углеводородного состава и некоторых микробиологических показателей микроперифита гидротехнических сооружений (Севастополь, Чёрное море) / Муравьёва И.П., Миронова Т.О., Енина Л.В. // Наукові записки Тернопільського нац. пед. ун-ту ім. В. Гнатюка. Сер.: Біологія. Спецвипуск: Гідроекологія. – 2010. - № 3 (44) – С. 182 – 186.
5. Заика В.Е. Митилиды Чёрного моря. / Заика В.Е., Валовая Н.А., Повчун А.С., Ревков Н.К. - Киев: Наук. думка, 1990. – 208 с.
6. Копытов Ю.П. Новый вариант тонкослойной хроматографии липидов и углеводородов / Копытов Ю.П. // Экология моря. – 1983. – Вып. 13. – С. 76 – 80.

7. Иванович Г. В. Особенности содержания гликогена и липидов у мидий в зоне берегоукрепительных сооружений одесского побережья / Иванович Г.В., Лисовская В.И // Мор.экол.журн.- 2004. – III, № 4, - С. 48 – 54.
8. Щекатурина Т. Л. Углеводороды автохтонного и аллохтонного происхождения и их преобразование в морских организмах / Щекатурина Т.Л. // Автореф. дисс.... докт.хим.наук. – Ростов-на-Дону, 1992. – 34 с.
9. Миронов О.Г. Потоки нефтяных углеводородов через морские организмы/ Миронов О.Г. // Мор.экол.журн.- 2006. – V, № 2, - С. 5 - 14.
10. Соловьёва О.В. Роль митилид (Mollusca: Mytilidae) в процессах самоочищения морской воды от нефтяных углеводородов / Соловьёва О.В. // Экология моря, 2007. – Вып.73. – С. 91 – 100.
11. Миронов О.Г. Мониторинг экологического состояния бухты Артиллерийская (Севастополь, Чёрное море) / Миронов О.Г., Алёмов С.В., Осадчая Т.С., Гусева Е.В., Миронова Т.О., Муравьёва И.П., Миронов О.А., Енинина Л.В., Алифанова Д.А., Волков Н.Г.// Мор.экол.журн.- 2012. – XI, № 1, - С. 41 - 52.
12. Mc Dowell J. Biological Contaminants of Marine Shelfish and Implications for Monitoring Population Impact. In: Buchsbaum R., Rederson J., Robinson W.E. (eds.) The Decline of Fisheries Resources in New England. Evaluating the Impact of Overfishing, Contamination, and Habitat Degradation. – 2005. – Р. 119 – 130.
13. Иванов В.А. Гидролого-гидрохимический режим Севастопольской бухты и его изменения под воздействием климатических и антропогенных факторов / Иванов В.А., Овсяный Е.И., Репетин Л.Н., Романов А С., Игнатьева О.Г. - МГИ НАНУ. – Севастополь: ЭКОСИ – Гидрофизика, 2006. - 90 с.

Муравйова І. П. Ліпідно – вуглеводневий склад *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) з обростань гідротехнічних споруджень Артилерійської бухти (Севастополь, Чорне море) / І.П. Муравйова, Т.О. Міронова // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2012. – Т. 25 (64), № 3. – С. 137-144.

Уперше розраховано, що мідія розміром 30 - 40 мм містить близько 2 мг нафтових вуглеводнів, розміром менше 10 мм близько 0,2 мг нафтових вуглеводнів. Проведені дослідження показали, що мідій з найбільш забруднених ділянок бухти відрізняються підвищеною кількістю ліпідів і вуглеводнів. Отримані результати можуть бути використані в моніторингових дослідженнях.

Ключові слова: мідій, ліпіди, нафтові вуглеводні, гідротехнічні споруди.

Muravjova I.P. Lipid-hydrocarbon composition of *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) from hydrotechnical constructions of the Artilleriskaya Bay (Sevastopol, the Black Sea) / I.P. Muravjova, T.O. Mironova // Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No 3. – P. 137-144.

It was estimated for the first time that mussel 30 - 40 mm long contains about 2 mg of oil hydrocarbons, while the mussel, which is less than 10 mm contains about 0.2 mg of oil hydrocarbons. Studies have resulted that the mussels from the most contaminated areas of the bay contain the increased amount of lipids and hydrocarbons. The results obtained can be used in monitoring researches.

Keywords: mussels, lipids, hydrocarbons, oil, hydrotechnical structures.

Поступила в редакцию 14.09.2012 г.

УДК 577.15.152:577.15.072/08/082

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ТИАМИНПИРОФОСФОКИНАЗЫ ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ МИОМЕТРИЯ

Оришака О.В., Вовчук И.Л., Кучеров В.А., Петров С.А.

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

Методом электрофореза в полиакриламидном геле изучены белковый спектр и многообразие молекулярных форм тиаминпирофосфокиназы немалигнизованный и опухолевой тканей миометрия. Разработан метод выделения изоформ тиаминпирофосфокиназы и идентификации их в гелевом блоке. Изучены электрофоретические характеристики идентифицированных белков. Показано, что процесс малигнизации сопровождается изменением белкового и ферментного спектра.

Ключевые слова: тиаминпирофосфокиназа, изоформы, электрофорез.

ВВЕДЕНИЕ

Тиаминпирофосфокиназа (КФ 2.7.6.2.), осуществляющая перенос пирофосфатной группировки от АТФ к тиамину, впервые была обнаружена в головном мозгу голубей и тонком кишечнике крыс. Затем рядом исследователей этот фермент был найден в экстрактах пивных и пекарских дрожжей [1]. Очоа [2] установил наличие тиаминпирофосфокиназы (далее Т-киназа) в тканях печени, мозга и скелетной мускулатуры голубя. Впоследствии этот фермент был обнаружен во многих органах и тканях различных животных [3-6], а также в соке поджелудочной железы и растениях [7].

Т-киназа из разных источников обладает различной удельной активностью. Самыми подходящими и доступными источниками для выделения этого фермента являются дрожжи и печень животных. Однако наиболее насыщен им сок поджелудочной железы. Высокоочищенные (в 200-250 раз) препараты Т-киназы, выделенные из пивных дрожжей, при электрофорезе на поликариламидном геле дают пять белковых зон, которые очень близко расположены друг к другу, что свидетельствует об их почти одинаковом молекулярном весе и заряде. Вполне возможно, что каждая зона, являясь изоизомом, при определенных условиях специфична к определенному нуклеотидтрифосфату. Все попытки выделить эти фракции индивидуально гель-фильтрацией и хроматографией пока не увенчались успехом [7].

При исследовании гомогенности Т-киназы из печени крыс методом электрофореза в 7 %-ном поликариламидном геле обнаруживаются две симметричные полосы, располагающиеся очень близко друг от друга. Поэтому раздельно их активность не исследовалась. В последнее время установлено, что Т-киназа обладает четвертичной структурой и, следовательно, изменение

концентрации ионов водорода может индуцировать конформационные изменения белковой глобулы, затрагивающие активный центр фермента. Не исключено также, что наличие нескольких оптимумов рН связано с существованием Т-киназы в виде множественных молекулярных форм [8].

Подобное изучение белковых спектров нормальных и патологических образцов позволяет обнаруживать биохимические маркеры определенных патологических состояний [9].

Работы по определению гомогенности препаратов обычно проводят с помощью электрофореза в 7 %-ном полиакриламидном геле. Однако, как было показано А.Л. Шварцманом [10], для некоторых ферментов, например, выделенных из опухолевой и нормальной тканей желудка человека, метод препартивного электрофореза позволяет не только подтвердить гомогенность препаратов ферментов, но и получить индивидуальные изоферменты.

В связи с этим, цель работы состояла в изучении электрофоретической характеристики водорастворимых белков и белков, полученных при солевом фракционировании из немалигнизированной и опухолевых тканей миометрия, а также в идентификации тиаминпирофосфокиназы непосредственно в гелевом блоке.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биологическим источником исследуемых белков служили образцы немалигнизированного миометрия, ткани доброкачественной (узловая фибролейомиома матки) и злокачественной (умеренно-дифференцированная лейомиосаркома матки) опухолей, которые были получены операционным путем у женщин, не проходивших дооперационного медикаментозного лечения. Патоморфологические диагнозы были верифицированы по международной классификации ВОЗ [11].

Образцы миометрия гомогенизировали с шестью объемами 0,25 М раствора сахарозы в условиях, предотвращающих разрушение субклеточных фракций. Гомогенат центрифугировали в течение 90 мин при 20 000 g (при + 4 °C). Белковый экстракт подщелачивали 0,5 М трис-HCl буфером до рН 7,7 и диализировали против 40 объемов дистиллированной воды при + 4 °C в течение 12 часов [12]. Постепенное фракционное осаждение проводили сульфатом аммония, насыщая белковый раствор до 20, 40, 60 и 80 % [12]. Для удаления избытка $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, препятствующего определению белка по методу Lowry [13], полученные фракции подвергали повторному диализу в тех же условиях.

Активность тиаминпирофосфокиназы определяли по количеству образовавшегося тиаминдифосфата [14]. Относительную активность выражали в нмоль тиамина на мг ткани за 1 мин инкубации при 37 °C, удельную активность – в пмоль тиамина на мг белка за 1 мин инкубации при 37 °C.

Электрофоретический анализ проводили на пластинах 140 × 140 × 1 мм в щелочной (трис-глициновый буфер, рН 8,3) среде в однородном 10 %-ном вертикальном полиакриламидном геле (“Reanal”, Венгрия) при температуре 25 °C в течение 4,5 часов [15]. Визуализацию белков проводили окраской гелей в растворе 0,25 %-ного раствора Кумасси голубого R-250 (“Serva”, Швеция), содержащего 45,0

%-ный этанол и 9,0 %-ную уксусную кислоту. Электрофореграммы получали сканированием влажных гелевых блоков с последующей компьютерной обработкой электрофореграмм с помощью программы ANAIS.

Методом препаративного электрофореза [16] на окрашенных Кумасси R-250 белковых полосах идентифицировали участки неокрашенного геля, содержащие иммобилизованные белки, в которых далее определяли активность тиаминпирофосфокиназы. В качестве контроля был взят участок гелевого блока после электрофореза в идентичных условиях, без наличия исследуемого материала в слотах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ электрофореграмм щелочного электрофореза цитозольной фракции водорастворимых белков немалигнлизированной и опухолевых тканей миометрия показал, что процесс малигнлизации сопровождается уменьшением количества регистрируемых белков с 15 – в образце ткани немалигнлизированного до 8 – в образце узловой фибролейомиомы матки и 9 – в образце умеренно-дифференцированной лейомиосаркомы матки (рис. 1, 2, 3). Белковый спектр немалигнлизированного миометрия представлен преимущественно малоподвижными и среднеподвижными белками, в ткани доброкачественной опухоли – среднеподвижными, а малигнлизированного миометрия – среднеподвижными белками и белками с большой электрофоретической подвижностью (табл. 1). Следует отметить, что для всех исследованных образцов миометрия характерно наличие «мажорных», не специфических белков с Rf 0,360 - 380 и Rf 0,680 - 710. Диализ приводил к потере медленноподвижных (Rf 0,063, 0,088, 0,130, 0,140, 0,160, 0,170, 0,250, 0,290) и среднеподвижных белков (Rf 0,330, 0,420, 0,540) немалигнлизированного миометрия, среднеподвижных белков (Rf 0,260, 0,340, 0,420, 0,500, 0,560) миометрия с доброкачественной опухолью, и к появлению дополнительных белков с различной электрофоретической подвижностью (Rf 0,110, 0,130, 0,250, 0,510, 0,570, 0,690, 0,850, 0,890) в малигнлизированном миометрии. «Быстрые» белки в образце злокачественной опухоли, которые не регистрировались ранее, скорее всего, являются продуктами деградации «мажорного» белка с Rf 0,400.

Нами установлено, что в процессе поэтапного фракционирования белков сульфатом аммония изменяются спектр суммарных белков и тиаминпирофосфокиназы. Так, при 20%-ном насыщении сульфатом аммония из образцов немалигнлизированного миометрия и миометрия с доброкачественной опухолью была фракционирована тиаминпирофосфокиназа с близкой электрофоретической подвижностью: Rf 0,690 – 0,710 (табл. 1). При этом насыщении из образца малигнлизированного миометрия были фракционированы один среднеподвижный обладающий ферментативной активностью белок с Rf 0,440 и один быстроподвижный белок с Rf 0,780 (табл. 1). При 40%-ном насыщении сульфатом аммония из всех тканевых образцов был фракционирован «мажорный» белок с Rf 0,690 - 0,710 (табл. 1). При этом насыщении из образца малигнлизированного миометрия были фракционированы специфические малоподвижные (Rf 0,120, 0,150, 0,160, 0,180, 0,190, 0,220, 0,250, 0,270) и быстроподвижные (Rf 0,590, 0,750, 0,780) белки. Наибольшее количество белков во

всех исследованных образцах было зарегистрировано при 60%-ном насыщении сульфатом аммония (табл. 1). Во всех исследованных образцах тканей были обнаружены «мажорные» быстроподвижные белки с Rf 0,680-0,710.

Таблица 1
Электрофоретическая характеристика белкового спектра ткани миометрия

Электро- форети- ческая подвиж- ность белков (Rf)	Спектр водорастворимых белков						Фракционирование белков $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$											
	до диализа			после диализа			20 % насыщение			40 % насыщение			60 % насыщение			80 % насыщение		
	A	B	V	A	B	V	A	B	V	A	B	V	A	B	V	A	B	V
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
0,019		+																
0,024	+																	
0,025					+													
0,053	+																	
0,054					+								+					
0,063	+																	
0,088	+																	
0,097					+													
0,110						+												
0,120													+					
0,130	+					+												
0,140	+																	
0,150						+							+	*				
0,160	+		+										+					
0,170	+																	
0,180													+	*				
0,190		+			+								+					
0,220						+							+	*		+	*	
0,230			+															
0,250	+	*				+	*						+	+	*	+		
0,260		+	*	+	*													
0,270													+					
0,290	+																	
0,310				+			+	*						+				
0,330	+																	
0,340		+											+			+		
0,350														+				
0,360			+			+	*											
0,370	+														+	*		
0,380		+		+	+	+		+					+		+	*		
0,390																	+	*
0,400					+	*												
0,420	+	*	+	*									+	*		+	*	
0,430													+	*		+	*	

Продолжение таблицы 1

0,440					+		+*												
0,450			+													+	+*		
0,500		+													+			+	
0,510						+													
0,520																+			
0,540	+																		
0,560		+															+		
0,570						+													
0,590															+				
0,600																	+		
0,680																		+*	
0,690							+*	+*	+*						+*	+*	+		
0,710	+	+*		+*			+*								+*				
0,720																		+*	
0,750															+				
0,770																		+	
0,780			+			+			+						+				
0,830																		+	
0,850																			
0,890																			
0,930																		+	
0,940				+															
0,950																		+	

Примечание: 1. * – фракции, обладающие ферментативной активностью.

2. А – немалигнлизированная ткань, Б – ткань доброкачественной опухоли, В – ткань злокачественной опухоли

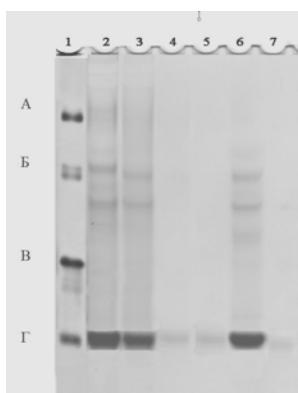


Рис. 1. Электрофорограмма растворимых белков и белков, фракционированных сульфатом аммония из ткани немалигнлизированного миометрия.

1 – белковые маркеры: А – сывороточный альбумин человека, Mr 66 500 Да;

Б - овальбумин - 43 000 Да, В - карбоангидраза - 30 000 Да, Г- РНК-аза- 13 700Да.

2 – водорастворимые белки (до диализа, нанесено 195,5 мкг белка);

3 – водорастворимые белки (после диализа, нанесено 93,6 мкг белка);

4 – фракция белков, осаждаемых при 20 %-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 10,9 мкг белка);

5 – фракция белков, осаждаемых при 40 %-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 40,6 мкг белка);

6 – фракция белков, осаждаемых при 60 %-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 66,7 мкг белка);
7 – фракция белков, осаждаемых при 80 %-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 1,2 мкг белка).

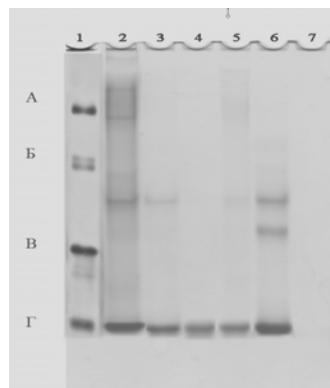


Рис. 2. Электрофореграмма растворимых белков и белков, фракционированных сульфатом аммония из ткани узловой фибролейомиомы матки.

1 – белковые маркеры: А – сывороточный альбумин человека, Мг 66 500 Да;
Б - овальбумин - 43 000 Да, В - карбоангидраза - 30 000 Да, Г- РНК-аза- 13 700Да.
2 – водорастворимые белки (до диализа, нанесено 281,8 мкг белка);
3 – водорастворимые белки (после диализа, нанесено 147,0 мкг белка);
4 – фракция белков, осаждаемых при 20 %-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 11,0 мкг белка);
5 – фракция белков, осаждаемых при 40 %-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 58,8 мкг белка);
6 – фракция белков, осаждаемых при 60 %-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 103,0 мкг белка);
7 – фракция белков, осаждаемых при 80 %-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 0,06 мкг белка).

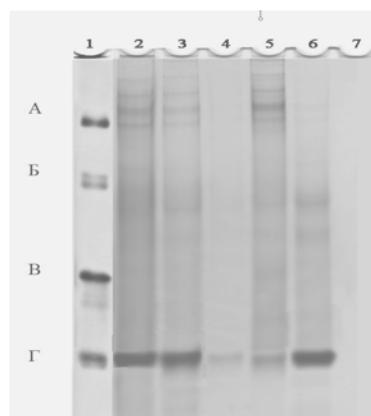


Рис. 3. Электрофореграмма растворимых белков и белков, фракционированных сульфатом аммония из ткани умеренно-дифференцированной лейомиосаркомы матки.

1 – белковые маркеры: А – сывороточный альбумин человека, Мг 66 500 Да;
Б – овальбумин - 43 000 Да, В - карбоангидраза - 30 000 Да,
Г- РНК-аза- 13 700Да.
2 – водорастворимые белки (до диализа, нанесено 207,9 мкг белка);
3 – водорастворимые белки (после диализа, нанесено 107,3 мкг белка);
4 – фракция белков, осаждаемых при 20 %-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 10,6 мкг белка);

5 – фракция белков, осаждаемых при 40 %-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 56,4 мкг белка);
6 – фракция белков, осаждаемых при 60 %-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 69,7 мкг белка);
7 – фракция белков, осаждаемых при 80 %-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 1,2 мкг белка).

Среднеподвижные «мажорные» белки с R_f 0,370-0,380, которые обладали ферментативной активностью, были обнаружены в образцах немалигнанизированной ткани и ткани доброкачественной опухоли. Характерной особенностью для немалигнанизированной ткани являлось наличие среднеподвижных белков (R_f 0,250, 0,310, 0,350, 0,450, 0,520), а для ткани малигнанизированного миометрия – появление белков средне- (R_f 0,220, 0,340, 0,430, 0,500, 0,560, 0,600) и быстроподвижных (R_f 0,770, 0,830, 0,930, 0,950), некоторые из них могли быть продуктами деградации соответствующих «мажорных» белков. При 80 %-ном насыщении сульфатом аммония только из немалигнанизированной ткани было фракционировано два белка, обладающих ферментативной активностью с электрофоретической подвижностью R_f 0,390 и R_f 0,720 (табл. 1).

Для выделения изоэнзимов тиаминпирофосфокиназы немалигнанизированной и опухолевой тканей миометрия был применен метод препаративного электрофореза в ПААГ, который позволял фракционировать до 40 мкг белка в одной пробе. Нами установлено, что процесс опухолеобразования в миометрии сопровождается увеличением количества множественных форм тиаминпирофосфокиназы. Исходная фракция растворимых белков немалигнанизированного миометрия характеризовалась наличием двух множественных форм тиаминпирофосфокиназы, которые, по данным электрофоретической подвижности относятся к медленно- и среднеподвижным белкам с R_f 0,250 и 0,420 (табл. 2). Водорастворимые белки миометрия с доброкачественной опухолью содержали три формы фермента: с R_f 0,260, 0,420 и 0,710, злокачественной опухоли – 1 форму с R_f 260 и другую форму фермента – с R_f 0,400 (табл. 3, 4).

После диализа во фракции растворимых белков немалигнанизированной ткани и ткани доброкачественной опухоли была идентифицирована одна «мажорная» форма тиаминпирофосфокиназы с R_f 0,710 и 0,690 (соответственно), а в образце малигнанизированного миометрия – одна «мажорная» форма фермента с R_f 0,690 и две формы с R_f 0,250 и 0,360 (табл. 2, 3, 4).

Данные литературы свидетельствуют о том, что тиаминпирофосфокиназа как индивидуальный белок может быть фракционирована из белкового раствора при 51-72 %-ном насыщении его сульфатом аммония [17]. Однако, мы установили, что поэтапное фракционирование приводит к более четкому разделению белков и позволяет получить высокоочищенные индивидуальные изоформы тиаминпирофосфокиназы с высокой удельной активностью фермента.

Таблица 2

Выделение изоферментов тиаминпирофосфокиназы из немалигнизированной ткани миометрия методом препаративного электрофореза в полиакриламидном геле, n=3

Фракция	Исходная фракция белка и изозимы	Содержание белка во фракции, мг	Относительная активность, нмоль тиамина / мг ткани	Удельная активность, пмоль тиамина / мг белка	Коэффициент очистки
Растворимые белки до диализа	Исходная фракция белка	0,1955±0,0196	0,0019±0,0002	0,0097±0,0001	1,00
	Изозим Rf 0,250	0,0016±0,0002	0,0009±0,0001	0,563±0,061	58,00
	Изозим Rf 0,420	0,0052±0,0006	0,0007±0,0001	0,135±0,015	13,88
Растворимые белки после диализа	Исходная фракция белка	0,0936±0,009	0,0018±0,0002	0,0192±0,002	1,00
	Изозим Rf 0,710	0,0026±0,0003	0,0009±0,0001	0,3462±0,031	18,03
20 % насыщение $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Исходная фракция белка	0,0109±0,002	0,0001±0,0001	0,0092±0,0009	1,00
	Изозим Rf 0,310	0,0009±0,0001	0,0014±0,0002	1,5556±0,153	169,09
	Изозим Rf 0,710	0,0018±0,0002	0,0020±0,0003	1,1111±0,031	120,77
40 % насыщение $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Исходная фракция белка	0,0406±0,0038	0,0008±0,0001	0,0197±0,005	1,00
	Изозим Rf 0,710	0,0080±0,0007	0,0010±0,0001	0,125±0,014	6,35
60 % насыщение $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Исходная фракция белка	0,0667±0,007	0,0010±0,0001	0,0150±0,002	1,00
	Изозим Rf 0,250	0,0031±0,0004	0,0012±0,0001	0,387±0,041	25,80
	Изозим Rf 0,380	0,0052±0,0006	0,0015±0,0002	0,289±0,030	19,27
	Изозим Rf 0,710	0,0063±0,0007	0,0017±0,0002	0,270±0,014	18,00
80 % насыщение $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Исходная фракция белка	0,0012±0,0001	0,0007±0,0001	0,5833±0,0623	1,00
	Изозим Rf 0,390	0,0006±0,0001	0,0015±0,0002	2,500±0,257	4,29
	Изозим Rf 0,720	0,0010±0,0001	0,0016±0,0002	1,600±0,168	2,74

Таблица 3

Выделение изоферментов тиаминпирофосфокиназы из ткани миометрия с доброкачественной опухолью методом препаративного электрофореза в полиакриламидном геле, n=3

Фракция	Исходная фракция белка и изозимы	Содержание белка во фракции, мг	Относительная активность, нмоль тиамина / мг ткани	Удельная активность, пмоль тиамина / мг белка	Коэффициент очистки
Растворимые белки до диализа	Исходная фракция белка	0,2818±0,0282	0,0042±0,0004	0,0149±0,0015	1,00
	Изозим Rf 0,260	0,0018±0,0002	0,0009±0,0001	0,500±0,051	33,56
	Изозим Rf 0,420	0,0050±0,0006	0,0007±0,0001	0,140±0,015	9,40
	Изозим Rf 0,710	0,0032±0,0003	0,0009±0,0001	0,2813±0,031	18,88
Растворимые белки после диализа	Исходная фракция белка	0,1470±0,009	0,0040±0,0003	0,0272±0,002	1,00
	Изозим Rf 0,690	0,0023±0,0003	0,0012±0,0002	0,5217±0,031	19,18
20 % насыщение $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Исходная фракция белка	0,0110±0,002	0,0011±0,0001	0,1000±0,010	1,00
	Изозим Rf 0,690	0,0014±0,0002	0,0019±0,0001	1,3571±0,153	13,57
40 % насыщение $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Исходная фракция белка	0,0588±0,0038	0,0011±0,0001	0,0187±0,002	1,00
	Изозим Rf 0,690	0,0058±0,0007	0,0021±0,0003	0,362±0,039	19,36
60 % насыщение $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Исходная фракция белка	0,1030±0,007	0,0008±0,0001	0,0078±0,0009	1,00
	Изозим Rf 0,370	0,0040±0,0004	0,0052±0,0006	1,300±0,15	166,67
	Изозим Rf 0,450	0,0050±0,0006	0,0056±0,0007	1,120±0,030	143,59
80 % насыщение $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Исходная фракция белка	0,00006±0,0001	0,000018±0,0002	3,0±0,32	1,00

Из немалигнизированной ткани при 20 %-ном насыщении сульфатом аммония, была получена фракция, представленная двумя формами фермента: одной «мажорной» с Rf 0,710 и второй формой фермента со средней электрофоретической подвижностью (Rf 0,310). Фракции, полученные при этом же насыщении сульфатом аммония из доброкачественной и злокачественной опухолей содержали по одной форме фермента: «мажорной» с Rf 0,690, среднеподвижной с Rf 0,440,

соответственно. При 40 %-ном насыщении сульфатом аммония во всех тканевых образцах миометрия было идентифицировано по одной «мажорной» форме фермента с близкими значениями электрофоретической подвижности Rf 0,690 и Rf 0,710, что, скорее всего, свидетельствует об идентичности этих форм. Кроме «мажорной» формы, в образце малигнизированного миометрия было установлено наличие трех малоподвижных форм фермента с Rf 0,150, 0,180 и 0,220 и одной среднеподвижной формы фермента с Rf 0,430 (табл. 4).

Таблица 4
Выделение изоэнзимов тиаминпирофосфокиназы из ткани злокачественной опухоли миометрия методом препаративного электрофореза в полиакриламидном геле, $n=3$

Фракция	Исходная фракция белка и изоизмы	Содержание белка во фракции, мг	Относительная активность, нмоль тиамина / мг ткани	Удельная активность, пмоль тиамина / мг белка	Коэффициент очистки
Растворимые белки до диализа	Исходная фракция белка	0,2079±0,0206	0,0026±0,0003	0,0125±0,0001	1,00
	Изоизим Rf 0,260	0,0020±0,0002	0,0009±0,0001	0,4500±0,041	36,00
	Изоизим Rf 0,400	0,0046±0,0005	0,0007±0,0001	0,1522±0,015	12,18
Растворимые белки после диализа	Исходная фракция белка	0,1073±0,011	0,0031±0,0003	0,0289±0,002	1,00
	Изоизим Rf 0,250	0,0031±0,0003	0,0012±0,0002	0,3871±0,031	13,39
	Изоизим Rf 0,360	0,0104±0,0013	0,0019±0,0002	0,1827±0,019	6,32
	Изоизим Rf 0,690	0,0028±0,0003	0,0011±0,0002	0,3929±0,041	13,60
20 % насыщение $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Исходная фракция белка	0,0106±0,002	0,0011±0,0002	0,1038±0,0109	1,00
	Изоизим Rf 0,440	0,0015±0,0002	0,0017±0,0002	1,133±0,122	10,92
40 % насыщение $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Исходная фракция белка	0,0564±0,006	0,0014±0,0002	0,0248±0,003	1,00
	Изоизим Rf 0,150	0,0037±0,0004	0,0064±0,0004	1,7297±0,174	69,75
	Изоизим Rf 0,180	0,0063±0,007	0,0062±0,0003	0,9841±0,098	39,68
	Изоизим Rf 0,220	0,0121±0,0013	0,0060±0,0003	0,4959±0,050	20,00
	Изоизим Rf 0,430	0,0140±0,0015	0,0068±0,0002	0,4857±0,049	19,58
	Изоизим Rf 0,690	0,0152±0,0016	0,0065±0,0005	0,4276±0,047	17,24

Продолжение таблицы 4

60 % насыще- ние (NH ₄) ₂ SO ₄	Исходная фракция белка	0,0697±0,007	0,0011±0,0001	0,0158±0,002	1,00
	Изозим Rf 0,220	0,0015±0,0002	0,0001±0,00001	0,066±0,008	4,18
	Изозим Rf 0,430	0,0055±0,0006	0,0023±0,0003	0,418±0,043	26,46
	Изозим Rf 0,680	0,0085±0,0009	0,0028±0,0003	0,3294±0,034	20,85
80 % насыще- ние (NH ₄) ₂ SO ₄	Исходная фракция белка	0,0012±0,0001	0,0018±0,0002	1,500±0,151	1,00

Спектр множественных форм тиаминпирофосфокиназы, полученный при 60 %-ном насыщении сульфатом аммония, характеризовался в немалигнизированном миометрии наличием «мажорного» быстроподвижного с Rf 0,710 и среднеподвижным «мажорным» белком с Rf 0,380 и одним медленноподвижным белком с Rf 0,250 (табл. 2); в доброкачественной опухоли – наличием одного «мажорного» белка с Rf 0,370 и среднеподвижного с Rf 0,450; малигнизированном миометрии – наличием одного «мажорного» белка с Rf 0,680, одного медленно- и среднеподвижного с Rf 0,220 и 0,430, соответственно.

При 80 %-ном насыщении сульфатом аммония (табл. 2, 3, 4) тиаминпирофосфокиназа была обнаружена только в немалигнизированной ткани: высокоподвижная с Rf 0,720 и среднеподвижная с Rf 0,390.

Анализ удельной активности и коэффициента очистки позволяет отметить важную особенность тиаминпирофосфокиназы, выделенной методом препаративного электрофореза. Обнаружено, что удельная активность индивидуальных форм фермента, выделенных из немалигнизированной и опухолевых тканей зависит от степени насыщения исходного раствора сульфатом аммония (табл. 2, 3, 4). Наибольшая удельная активность, а, следовательно, и коэффициент очистки установлены для фермента, фракционированного при 40 %-ном насыщении сульфатом аммония из злокачественной опухоли и фракционированного при 60%-ном насыщении сульфатом аммония - из доброкачественной опухоли (в 69,75 и 166,67 раз, соответственно). По всей видимости, метод электрофоретического разделения способствует иммобилизации тиаминпирофосфокиназы в ПААГе, которая приводит к конформационным изменениям, способствующим повышению активности и стабильности фермента, что было показано и другими исследователями для других ферментов [10, 18].

Расширение изоформенного спектра тиаминпирофосфокиназы, наблюдаемое при злокачествлении в миометрии совпадает с результатами исследования карбоксипептидазы А в процессе малигнизации яичников [19] и отличается от результатов исследования изоформенного спектра гексокиназы при раке желудка [10] и изоформенного спектра карбоксипептидазы А при раке эндометрия [16].

ВЫВОДЫ

1. Процесс малигнизации ткани миометрия сопровождается изменением белкового спектра и расширением изоформного состава тиаминпирофосфокиназы.
2. Повышением удельной активности иммобилизованных в поликариламидном геле изоформ тиаминпирофосфокиназы за счет их конформационных изменений.

Список литературы

1. Weil-Malherbe H. The enzymic phosphorylation of vitamin B1 / H. Weil-Malherbe // J. Biochem. – 1939. – V. 33. – P. 1997-2007.
2. Ochoa S. Enzyme synthesis of cocarboxylase in aminal tissues / S. Ochoa // J. Bioshem. – 1939. – V. 33, N 9. – P. – 1262-1270.
3. Thoai N. Purification of thiamine phosphorylation proteins / N. Thoai, L. Chevillard // Bull. Soc. Chem. Biol. – 1949. – V. 31, N 1. – P. 204-212.
4. Kaziro Y. Studies of thiaminokinase from baker's yeast. Nucleotide specificity / Y. Kaziro // J. Biochem. – 1959. – V. 46, N 12. – P. 1587-1596.
5. Deus B. Radiometric assay procedure for thiamine pyrophosphokinase activiti / B. Deus, H. Blum, H. Holzer // Annal. Biochem. – 1969. – V. 27, N 3. – P. 492-501.
6. Mano Y. Studies on enzymatic synthesis of cocarboxylase in animal tissue. Purification and properties of thiaminokinase from rat liver / Y. Mano // J. Biochem. – 1960. – V. 47, N 3. – P. 283-290.
7. Островский Ю.М. Кокарбоксилаза и другие тиаминфосфаты / Ю.М. Островский. – Минск : Наука и техника, 1974. – 256 с.
8. Воскобоев А.И. Биосинтез, деградация и транспорт фосфорных эфиров тиамина / А.И. Воскобоев, И.П. Черникович. – Минск : Наука и техника, 1987. – 200 с.
9. Marshall T. The simplified technique of high resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis: biomedical applications in health and disease / T. Marshall, K. Williams // Electrophoresis. – 1991. – V. 12. – P. 461-471.
10. Шварцман А.Л. О структуре и функциях гексокиназы в раковых клетках человека: автореф. дис. на соискание ученой степени канд. биол. наук : спец. 03.00.04. «Биохимия» / А.Л. Шварцман. – Ленинград, 1975. – 28 с.
11. Всемирная Организация Здравоохранения / Материалы ежегодных отчетов. – Санкт-Петербург, 1981. – 286 с.
12. Ферменты / Под ред. Браунштейна А.Е. – М. : Наука, 1964. – 312 с.
13. Lowry O.H. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.I. Rosenbrough, A.Z. Fan, R.J. Randol // J. Biol. Chem. – 1951. – V. 193. – P. 265-275.
14. Елисеева Г.Д. Флуориметрическое определение тиамина, кокарбоксилазы и рибофлавина в биологических объектах / Г.Д. Елисеева // Витамины. – 1953. – Т. 1. – С. 38-57.
15. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). / Остерман Л.А. – М. : Наука, 1981. – 288 с.
16. Вовчук И.Л. Выделение и идентификация молекулярных форм карбокси пептидазы А опухолевой ткани эндометрия матки женщин / И.Л. Вовчук, В.А. Кучеров, С.А. Петров // Вісник ХНУ. – 2006. – Вип. 4, № 748. – С. 21-32.
17. Арцукевич И.М. Очистка и некоторые свойства тиаминпирофосфокиназы из печени крыс / И.М. Арцукевич, А.И. Воскобоев, Ю.М. Островский // Вопр. мед. химии. – 1977. – Т. 23, № 2. – С. 203-210.
18. Тривен М. Иммобилизованные ферменты / М. Тривен. – М.: Мир, 1983. – 213 с.
19. Вовчук И.Л. Выделение и идентификация изоферментов карбокси пептидазы А из опухолевых тканей яичников / И.Л. Вовчук // Вісник ОНУ. – 2006. – Т. 11, вип. 1. – С. 34-50.

Оришака О.В. Виділення й ідентифікація тіамінпірофосфокінази пухлинної тканини міометрія / О.В. Оришака, І.Л. Вовчук, В.А. Кучеров, С.А. Петров // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2012. – Т. 25 (64), № 3. – С. 145-157.

Методом електрофорезу в поліакриламідному гелі вивчені білковий спектр і різноманітність молекулярних форм тіамінпірофосфокінази немалігнізованої та пухлинної тканин міометрія. Розроблений метод виділення ізоформ тіамінпірофосфокінази та ідентифікації їх у гелевому блоці. Вивчені електрофоретичні характеристики ідентифікованих білків. Показано, що процес пухлиноутворення супроводжується змінами білкового та ферментного спектру.

Ключові слова: тіамінпірофосфокінази, ізоформи, електрофорез.

Orishaka O. V. Extracting and identification of thiamine pyrophosphokinase from tumour myometrium tissue / O.V. Orishaka, I.L. Vovchuk, V.A. Kucherov, S.A. Petrov // Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No 3. – P. 145-157.

Protein spectrum and molecular forms variety of thiamine pyrophosphokinase from the nonmalignant and tumour myometrium tissues were studied by the method of polyacrylamide gel electrophoresis. A method of extracting thiamine pyrophosphokinase isoenzymes and their identification in gel blocs was elaborated. Electrophoretic characteristics of the identified isoenzymes were studied. It has been shown that malignization process is accompanied by changes in protein and enzyme spectra.

Keywords: thiamine pyrophosphokinase, isoenzymes, electrophoresis.

Поступила в редакцию 14.09.2012 г.

УДК 577.112.85:543.635.24

ПРОГНОЗУВАННЯ СТРУКТУР ВІЛЬНИХ ОЛІГОСАХАРИДІВ ПЛАЗМИ КРОВІ ПРАКТИЧНО ЗДОРОВИХ ДОНОРІВ

Письменецька І.Ю.¹, Баттерс Т.Д.²

¹*Дніпропетровська державна медична академія, Дніпропетровськ, Україна*

²*Інститут глікобіології Оксфордського університету, Оксфорд, Велика Британія*

E-mail: pirina2004@list.ru

Вільні олігосахариди (ВО) – це не пов’язані з глікокон’югатами глікані, продукти їх синтезу та деградації. Ретельний аналіз гліканів є надзвичайно складним через їх величезне структурне різноманіття. Стаття присвячена вивченню можливості використання інформації про внутрішньоклітинні ВО та електронні бази даних гліканів глікокон’югатів для передбачення структур ВО плазми крові. Експериментально отримані хроматографічні спектри ВО плазми крові здорових донорів порівнювали зі структурами гліканів та їх спектрами, що наведені в наукових публікаціях та електронних базах даних GlycoBase і EUROCarbDB. Такий підхід дозволив запропонувати можливі структури вуглеводів для основних піків хроматографічних спектрів ВО плазми крові з метою розробки шляхів їх подальшого експериментального аналізу.

Ключові слова: вільні олігосахариди, плазма крові, ВЕРХ-спектри гліканів, електронні бази даних GlycoBase і EUROCarbDB.

ВСТУП

Вільні олігосахариди (ВО) – це не пов’язані з глікокон’югатами глікані та продукти їх деградації, що утворюються в процесі глікозилювання, клітинного контролю фолдінгу у ендоплазматичному ретикулуму і лізосомального розпаду глікопротеїнів, гліколіпідів, протеогліканів та глікозилфосфотиділінозитольних якорів. Яким шляхом та з яких саме джерел ВО клітин потрапляють до плазми крові ще невідомо, але інформацію про будову внутріклітинних гліканів та олігосахаридної частки глікокон’югатів, яка доступна з публікацій та баз даних, цілком доречно застосувати для передбачення можливих структур ВО плазми крові.

Існує 3 головних портали інформаційних баз даних: 1) Міжнародний консорціум з функціонального глікому (Consortium for Functional Glycomics – www.functionalglycomics.org) 2) Кіотська енциклопедія генів і геномів (KEGG GLYCAN – www.genome.jp/kegg/glycan) 3) Глікобіологічна ініціатива інституту раку Німеччини (Glycosciences – www.glycosciences.de) та окремі бази даних з детальною інформацією по вузьким питанням глікобіології: про лектини тварин (A Genomics Resource for Animal Lectins – www.imperial.ac.uk/research/animallectins/), про тривимірні структури лектинів (Three-dimensional Lectin Database – www.cermav.cnrs.fr/lectines/), про вуглеводи бактерій (Bacterial Glycan Database –

csdb.glycoscience.ru/bacterial/), про ферменти, що беруть участь в синтезі вуглеводів (CAZy – www.cazy.org/Enzyme-Glyco-Resources.html) та інші [1–5].

В якості джерела інформації для нашої роботи було вибрано дві електронні бази даних GlycoBase (www.glycobase.nibrt.ie/glycobase/show_nibrt.action) та EUROCarbDB (www.eurocarbdb.org/). Перша створена і підтримується Dublin-Oxford Glycobiology Lab., а EUROCarbDB – продукт роботи міжнародного колективу, що був створений за фінансовою підтримкою 6-ї Рамкової програми Євросоюзу. Обидві бази містять дані про хроматографічні профілі гліканів в глікопротеїнах. GlycoBase включає більше 675 структур N-гліканів, O-гліканів та продуктів їх деградації екзоглікозідазами. З них 168 структур було виявлено в плазмі крові людини. EUROCarbDB серед 50000 гліканів містить більше 2000 структур вуглеводів, які було знайдено в глікопротеїнах людини та їх хроматографічні характеристики [6–9].

У попередніх дослідженнях нами були отримані хроматографічні спектри загального пулу вільних олігосахаридів плазми крові практично здорових донорів [10] та з'ясована його гетерогенність по заряду [11]. Метою даної роботи було вивчення можливості застосування інформації з відкритої літератури та електронних баз даних GlycoBase, EUROCarbDB про структури внутрішньоклітинних вільних гліканів та гліканів глікокон'югатів для аналізу структури вільних олігосахаридів плазми крові.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Плазма крові практично здорових донорів (n=10) була зібрана у Дніпропетровській медичній академії. Донори були у віці від 46 до 52 років.

У роботі застосовували реактиви фірм VWR International та Sigma-Aldrich.

Депротеїнізацію нативної плазми проводили шляхом осадження білків 10% трихлороцтвою кислотою (ТХО) з наступним центрифугуванням впродовж 10 хвилин при 3000 об/хв. [12]. Залишки білків з плазми вилучали шляхом фільтрації за допомогою фільтру з гідрофільною поліфлуороетиленовою (PTFE) мембраною (Millex-LH,0.45 μ m, Millipore Corp., США) згідно [13]. Для вилучення глукози з біологічної рідини застосовували адсорбційну хроматографію на пористому графіті з використанням колонки PGC (Thermo Electron Corp., Runcorn, UK) на 1мл (25мг/мл) згідно з методикою [13].

Вільні олігосахариди маркували 2-амінобензойною (антраніловою) кислотою - 2-AA (Sigma - Poole, Dorset, Велика Британія) згідно з методикою, наведеною у роботі Neville D.C.A. et.al. [14]. Очищення 2-AA-маркованих олігосахаридів проводили шляхом твердофазної екстракції на колонках Speed SPE Cartridges Amide-2, (Applied Separations, США) [13].

Марковані глікани поділяли на нейтральні та заряджені іонообмінною хроматографією на QAE- Sephadex (Q25-120) після нанесення їх на колонку та промивки Milli-QTM H₂O шляхом елюції нейтральних гліканів оцтовою кислотою, а заряджених - амоній ацетатом згідно з Neville D.C.A. et al.[14].

Аналіз маркованих олігосахаридів проводили шляхом нормальнофазової високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) на хроматографі фірми Waters (Велика Британія) з колонкою 4.6x250-mm TSK gel-Amide 80 (Anachem, Luton, Beds, Велика Британія) згідно з методикою, наведеною у роботах Neville D.C.A. et.al.

[14,15]. Хроматографічні піки характеризували у глюкозних одиницях (ГО) шляхом порівняння із глюкозними олігомерами частково гідролізованого декстрану в якості зовнішнього стандарту згідно з Neville D.C.A. et al.[14].

Для збору та обробки даних застосовували комп'ютерні програми Waters Millennium чи Waters Empower, Peak Time та Microsoft Office Excel 2003 та електронні бази даних GlycoBase та EUROCARBDB.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Досліджували олігосахариди, що мали у своєму складі 4 та більше моносахаридних залишків, тому аналізували ВЕРХ-спектри у відрізку часу від 20 до 42 хвилин. Порівнювали характеристики піків – глюкозні одиниці (ГО) – загального пулу, нейтральних (незаряджених) та кислих (заряджених) вільних олігосахаридів плазми крові практично здорових донорів із відомими з наукових публікацій характеристиками піків внутрішньоклітинних вільних олігосахаридів та гліканів глікопротеїнів, які зібрані у електронних базах даних.

На рис.1 наведені ВЕРХ-спектри ВО плазми крові в порівнянні з ВЕРХ-спектрами частково гідролізованого декстрану для визначення ГО кожного піку.

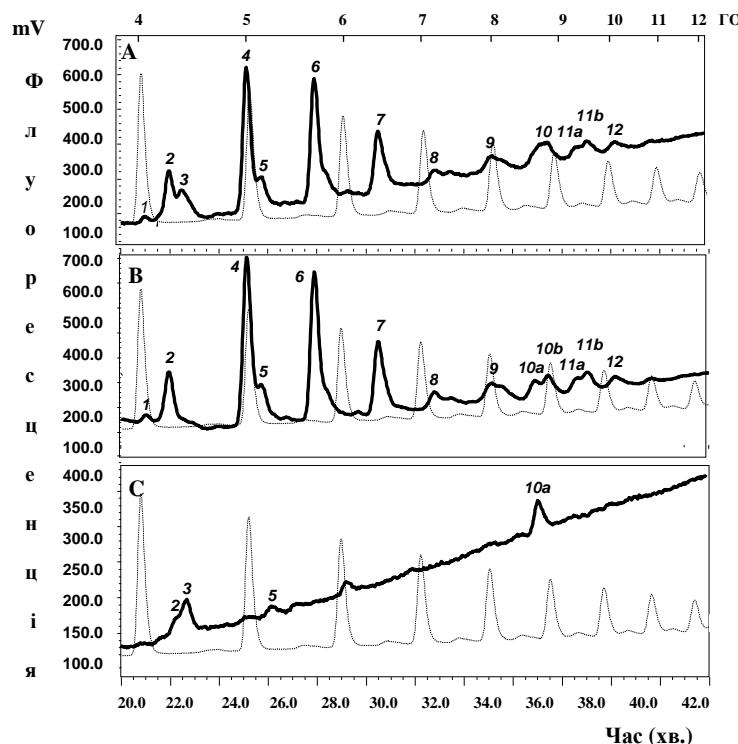


Рис.1. ВЕРХ-спектри вільних олігосахаридів плазми крові практично здорових донорів (суцільна лінія) та ВЕРХ-спектри зовнішнього стандарту – частково гідролізованого декстрану (пунктирна лінія)

А – загальні ВО, В – незаряджені ВО, С – заряджені ВО

Таблиця 1

Характеристики ВЕРХ-піків ВО плазми крові і відповідні структури внутрішньоклітинних ВО та гліканів глікопротеїнів

№ піку	ВО плазми (ГО)	Структури внутрішньоклітинних ВО	Структури гліканів глікопротеїнів з баз даних		
1	4,08 ±0,01				
2	4,28 ±0,01				
3	4,40 ±0,01				
4	5,01 ±0,01				
5	5,17 ±0,03				
6	5,69 ±0,01				
7	6,40 ±0,01				
8	7,08 ±0,01				
9	7,85 ±0,01				
10	8,62 ±0,02				
11	9,40 ±0,02				
12	9,93 ±0,03				

■ -N-ацетилглюкозамін, ● -маноза, ▲ -глюкоза, ○ -галактоза, ♦ -сіалова кислота, ▼ -фукоза
 □ -N-ацетилгалактозамін

В табл.1 представлена характеристики 12 визначених піків ВЕРХ-спектрів ВО плазми та структури гліканів з відповідними глюкозними одиницями. Нумерація піків в таблиці відповідає нумерації на рис.1.

Всередині клітини головними джерелами вільних олігосахаридів є початкові етапи N-глікозилювання, асоційована з ендоплазматичним ретикулумом деградація білків, які не пройшли клітинного контролю фолдінгу, та лізосомальна деградація зрілих глікокон'югатів [16, 17]. До джерел ВО біологічних рідин можуть додаватися ще зовнішні – процеси відщеплення гліканів від глікокон'югатів глікозидазами на поверхні клітин чи ферментами плазми крові.

Структури вільних олігосахаридів, що виникають на початкових етапах N-глікозилювання та в процесі контролю фолдінгу, добре відомі та вивчені детально [18]. Перш за все, це сам кор N-глікану – $\text{Man}_3\text{GlcNac}_2$ – та його попередники в синтезі. А також велика кількість поліманозних олігосахаридів, що синтезуються до утворення так званого олігосахаріда-попередника, з якого буде з'являтися усе різноманіття N-гліканів, – $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNac}_2$ – та їх глюкозильовані похідні. Пул цих гліканів може мати один чи два залишки N-ацетилглюкозаміну, що відмічено у таблиці дужками. Відповідні характеристики (ГО) ВЕРХ-спектрів цієї сукупності гліканів було взято з роботи [13], в якій умови проведення нормальнофазової високоефективної рідинної хроматографії повністю збігалися з умовами методу, застосованому в наших дослідженнях. Структури гліканів з цих джерел, характеристики спектрів яких відповідають глюкозним одиницям експериментальних ВЕРХ-спектрів ВО плазми крові, наведені у таблиці як «Структури внутрішньоклітинних ВО». Лізосомальна та зовнішньоклітинна деградація глікокон'югатів – це джерела ВО із значно більшим різноманіттям структур. Велику кількість таких структур з відповідними глюкозними одиницями було знайдено в базах даних. Головні з них наведені у таблиці.

Зібрані дані свідчать про те, що для 11 з 12 піків існують відповідні структури серед внутрішньоклітинних ВО – високоманозні нейтральні глікани. Але пік 3 не може бути нейтральним згідно з розподілом ВО плазми по заряду. Тому тільки 10 піків можуть включати такі структури. Деякі піки, наприклад 10 та 11, складаються з 2 подпіків (а та b), що свідчить про присутність щонайменш 2-х структур у кожному. Згідно з таблицею, пік 10a може бути двохантенним комплексним гліканом з двома залишками сіалових кислот, а пік 10b – високоманозним нейтральним гліканом з 1 чи 2 залишками N-ацетилглюкозаміну. Він може включати також залишок глюкози, чи бути більш складною структурою – двохантенним комплексним гліканом з залишками фукози. Обидва подпіки піку 11 – це незаряджені глікани. Можливо один з них – високоманозний глікан $\text{Man}_9\text{GlcNac}_2$, а другий – комплексний глікан. На загальній хроматограмі 2 та 5 піки на подпіки не розділяються, але розподіл по заряду виявляє в них як нейтральні, так і заряджені олігосахариди.

Отримана таблиця гліканових структур дозволяє розробити стратегію подальшого аналізу вільних олігосахаридів плазми крові. Афінна хроматографія з лектином коновалії (ConA) дозволить відділити високоманозні та нейтральні двох

антенні комплексні глікани від інших. Ферментативна деградація може дати ще більш детальну інформацію про будову вільних олігосахаридів плазми.

ВИСНОВКИ

1. Використання характеристик хроматографічних спектрів внутрішньоклітинних вільних олігосахаридів та інформації стосовно структур гліканів глікопротеїнів, яка надана в електронних базах даних GlycoBase і EUROCcarbDB, дозволило визначити сукупність найбільш ймовірних структур вуглеводів для усіх піків ВЕРХ-спектрів вільних олігосахаридів плазми крові практично здорових донорів.
2. Наявність передбачуваних структур дає можливість розробити стратегію подальшого експериментального аналізу ВЕРХ-спектрів.

ПОДЯКИ

Роботу було виконано при підтримці міжнародного гранту EMBO (ASTF201-2010) та Інституту глікобіології Оксфордського університету (м.Оксфорд, Велика Британія) у лабораторії доктора Террі Д. Баттерса (Terry D. Butters).

Список літератури

1. Aoki-Kinoshita K.F. Bioinformatics approaches in glycomics and drug discovery / K.F. Aoki-Kinoshita, M. Kanehisa // Curr Opin Mol Ther. – 2006.– Vol.8(6): – 514–520.
2. Ranzinger R. GlycomeDB – integration of open-access carbohydrate structure Databases / R. Ranzinger, S. Herget, T. Wetter [et al.] // BMC, Bioinformatics – 2008. – Vol.19. – P.379–384.
3. Kanehisa M. The KEGG database / M. Kanehisa // Novartis Found Symp. – 2002. – Vol.247. – P.91–101.
4. Hashimoto K. KEGG as a glycome informatics resource / K. Hashimoto, S. Goto, S. Kawano [et al.] // Glycobiology – 2006. – Vol.16(5). – P.63R–70R.
5. Lütteke T. GLYCOSCIENCES.de: an Internet portal to support glycomics and glycobiology research / T. Lütteke, A. Bohne-Lang, A. Loss [et al.] // Glycobiology – 2006. – Vol.16 (5). – P.71R–81R.
6. Campbell M.P. GlycoBase and autoGU: tools for HPLC-based glycan analysis / M.P. Campbell, L.Royle, C.M. Radcliffe [et al.] // Bioinformatics – 2008. – Vol.1, №24 (9). – P.1214–1216.
7. Harvey D. J. Proposal for a standard system for drawing structural diagrams of *N*- and *O*-linked carbohydrates and related compounds / D.J. Harvey, A.H. Merry, L.P. Royle [et al.] // Proteomics – 2009. – Vol.9. – P.3796–3801.
8. Harvey D.J. Symbol nomenclature for representing glycan structures: Extension to cover different carbohydrate types / D.J. Harvey, A.H. Merry, L. Royle // Proteomics – 2011. – Vol.11 (22). – P.4291–4295.
9. von der Lieth C.-W. EUROCcarbDB: An open-access platform for glycoinformatics / C.-W. von der Lieth, A.A. Freire, D. Blank // Glycobiology – 2011. – Vol.21 (4). – P. 493–502.
10. Письменецька І.Ю. Вільні олігосахариди плазми крові практично здорових донорів/І.Ю. Письменецька, Т.Д. Баттерс // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2012.–Т.25 (64) , №1. – С.182–187.
11. Письменецька І.Ю. Фракціонування по заряду вільних олігосахаридів плазми крові практично здорових донорів/І.Ю. Письменецька, Т.Д. Баттерс // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2012.–Т.25 (64) , №2. – С.126–131.
12. Письменецька І.Ю. Хроматографічний аналіз іммобілізованих на паперових носіях модельних олігосахаридів / І.Ю. Письменецька, Т.Д. Баттерс // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2011.–Т.24 (63), №4. – С.183–191.

13. Alonzi D.S. Glucosylated free oligosaccharides are biomarkers of endoplasmic reticulum alpha-glucosidase inhibition / D.S. Alonzi, D.C. Neville, R.H. Lachman [et al.] // Biochem J. – 2008. – Vol.409, №2. – P.571–580.
14. Neville D.C. Analysis of fluorescently labelled glycosphingolipid-derived oligosaccharides following ceramide glycanase digestion and anthranilic acid labelling / D.C. Neville, V. Coquard, D.A. Priestman [et al.]. //Anal Biochem.-2004. – V.331. – P.275–282.
15. Neville D.C. Development of a single column method for the separation of lipid- and protein-derived oligosaccharides / D.C. Neville, R.A. Dwek, T.D. Butters // J. Proteome Res. – 2009. – Vol.8. – P.681–687.
16. Parodi A.J. Role of N-oligosaccharide endoplasmic reticulum processing reactions in glycoprotein folding and degradation //Biochem J. – 2000. – Vol. 348. – P.1–13.
17. Winchester B. Lysosomal metabolism of glycoproteins / B. Winchester // Glycobiology – 2005. – Vol.15, № 6. – P.1R–15R.
18. Benyair R Protein quality control, retention, and degradation at the endoplasmic reticulum / R. Benyair, E. Ron , G.Z. Lederkremer //Int Rev Cell Mol Biol. – 2011. – Vol. 292. – P.197–280.

Письменецька І.Ю. Прогнозування структур свободних олигосахаридів плазми крові практически здорових донорів. / І.Ю. Письменецька, Т.Д. Баттерс // Ученые записки Таврійского национального університета ім. В.І. Вернадского. Серия «Біологія, хімія». – 2012. – Т. 25 (64), № 3. – С.158-164.

Свободные олигосахариды (СО) – это не связанные с гликоконъюгатами гликаны, продукты их синтеза и деградации. Точный анализ структур гликанов чрезвычайно сложен из-за их огромного разнообразия. Данная статья посвящена изучению возможности использования информации о внутриклеточных СО и электронных баз данных по гликанам гликоконъюгатов для предсказания структур СО плазмы крови. Экспериментально полученные хроматографические спектры СО плазмы крови практически здоровых доноров сравнивали со структурами гликанов и их спектрами, приведенными в научных публикациях и в электронных базах данных GlycoBase и EUROCcarbDB. Такой подход позволил предложить возможные структуры углеводов для основных пиков хроматографических спектров СО плазмы крови для разработки путей их дальнейшего экспериментального анализа.

Ключевые слова: свободные олигосахариды, ВЭЖХ-спектры гликанов, электронные базы данных GlycoBase и EUROCcarbDB.

Pismenetskaya I.U. A structure prediction of blood plasma free oligosaccharides of practically healthy donors / I.U. Pismenetskaya, T.D. Butters // Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No. 3. – P. 158-164.

Free oligosaccharides (FOS) are glycans unbound to glycoconjugates, the products of their synthesis and degradation. An accurate analysis of glycan structures is extremely complex because of their enormous diversity. This article is devoted to exploring the possibility of using the information on intracellular FOS and electronic databases on glycans of glycoconjugates to predict blood plasma FOS structures. The chromatographic profiles of plasma FOS of healthy donors obtained experimentally were compared with the structures of glycans and their profiles shown in scientific publications and electronic databases GlycoBase and EUROCcarbDB. This approach allowed us to offer the possible structures of carbohydrates for the main peaks of the chromatographic spectrum from blood plasma to develop the ways to further experimental analysis.

Keywords: free oligosaccharides, HPLC-profiles of glycans, electronic databases GlycoBase and EUROCcarbDB.

Поступила в редакцию 11.09.2012 г.

УДК 612.821:577.152

РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА В РЕАЛИЗАЦИИ МИКРОВАСКУЛЯРНЫХ ЭФФЕКТОВ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО МИЛЛИМЕТРОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Раваева М.Ю.

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

В статье рассматривается влияние низкоинтенсивного миллиметрового излучения на систему синтеза оксида азота. Корреляционный анализ показателей микроциркуляции и системы синтеза оксида азота показал, что 10-тикратное низкоинтенсивное мм-воздействие приводит к оптимизации функциональной активности системы синтеза оксида азота за счет использования циркулирующих пулов нитрит-аниона в крови в оксид азота.

Ключевые слова: микроциркуляция, оксид азота.

ВВЕДЕНИЕ

В наших исследованиях [1, 2] установлено, что в механизмах биологического действия низкоинтенсивного миллиметрового (мм) излучения (длина волны 7,1 мм, ППМ 0,1 мВт/см²) на микроциркуляторные процессы основную роль играют эндотелий-зависимый, миогенный эндотелий-независимый и нейрогенный компоненты регуляции тканевого кровотока. Так, 10-тикратное мм-воздействие приводит к увеличению амплитуд эндотелиальных (Аэ) (максимально на 47,53%; $p \leq 0,05$), миогенных (Ам) (максимально на 56,24%; $p \leq 0,01$), нейрогенных (Ан) (максимально на 29,03%; $p < 0,05$) и пульсовых (Ап) (максимально на 48,37%; $p < 0,05$) на фоне снижения амплитуд дыхательных (Ад) (на 55,9%; $p < 0,05$) ритмов, следствием чего является увеличение выработки вазодилататоров, снижение периферического сопротивления в области артериол и прекапилляров, увеличение притока крови в микрососудистое русло на фоне улучшения венулярного оттока. Кроме этого, на основании результатов проведенных фармакологических проб предполагается влияние мм-излучения в первую очередь на продукцию оксида азота микроциркуляторным эндотелием. Это предположение находит свое подтверждение в биохимических исследованиях показателей системы синтеза оксида азота в плазме крови [3], в которых установлено, что мм-излучение значительно и избирательно повышает окислительный метаболизм аргинина, приводящий к синтезу оксида азота за счёт высокоспецифической активации его окислительного конститутивного (Ca²⁺-зависимого) *de novo* синтеза. В связи с этим, улью настоящего исследования является установление функциональной зависимости между различными звеньями регуляции микроциркуляции и параметрами системы синтеза оксида азота в организме человека при действии мм-излучения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании принимали участие 70 студентов-волонтеров женского пола в возрасте 21-23 года, условно здоровых. Мм-воздействие осуществлялось по описанной ранее методике [1, 2].

Реакции микрососудистого эндотелия на мм-воздействие исследовали с помощью анализатора микроциркуляции крови «ЛАКК-02» и прибора для проведения функциональных проб «ЛАКК-ТЕСТ» (Россия, «Лазма») [1, 2].

Исследование системы синтеза оксида азота проводилось биохимическими методами до и после мм-воздействия в лаборатории нанобиотехнологий Института биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины (г. Киев). Методика исследования описана в [3].

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью пакета «Статистика 5,5». Достоверность различий исследуемых показателей до и после мм-воздействия определялась с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни, корреляционные связи вычислялись методом Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ корреляционных взаимоотношений между параметрами микроциркуляции и показателями системы синтеза оксида азота (табл. 1) показал, что до мм-воздействия доминировали аргиназный и синтазный кальций-независимый пути синтеза оксида азота на фоне слабовыраженного кальций-зависимого. После 10-тикратного мм-воздействия, наоборот, доминирующим становится окислительный кальций-зависимый путь синтеза оксида азота на фоне подавления аргиназного.

Известно, что продукция оксида азота лежит в основе эндотелий-зависимой вазодилатации и результатом повышения концентрации cNOS в плазме крови является увеличение синтеза NO эндотелием. Поскольку в микроциркуляторном русле частотный диапазон секреторной активности эндотелия и синтеза NO совпадают и находятся в диапазоне 0,1 Гц, логичным является наличие функциональной связи между амплитудой эндотелиальных колебаний и показателями синтеза NO. Так, результаты корреляционного анализа (табл. 1) позволили установить сильную корреляционную зависимость ($p \leq 0,05$) амплитуд эндотелиальных колебаний с cNOS ($r=0,46$), % нитрита ($r=-0,46$) и отрицательную связь с аргиназой ($r=-0,43$) и аргиназа/NOS ($r=-0,64$). После 10-тикратного КВЧ-воздействия характер зависимости несколько изменился: усиливается связь с cNOS ($r=0,69$) и % нитрита ($r=-0,43$), исчезает отрицательная корреляция с аргиназой и аргиназа/NOS, а также появляются новые корреляции АЭ с количеством нитрита ($r=-0,52$), мочевиной ($r=-0,51$) и суммарной NOS ($r=0,69$).

Можно заключить, что 10-тикратное мм-воздействие приводит к перестройке функциональных связей эндотелиальных колебаний и системы синтеза оксида азота, в результате чего доминирующим становится окислительный кальций-зависимый путь синтеза оксида азота на фоне подавления аргиназного.

Таблица 1.

Матрица корреляционного анализа показателей синтеза оксида азота и осцилляторных показателей ЛДФ-грамм

Показатели	До КВЧ-воздействия					После КВЧ-воздействия				
	АЭ	АМ	АН	АП	АД	АЭ	АМ	АН	АП	АД
cNOS, пмоль/мин/мг белка	0,46		0,40	0,41	0,36	0,69	0,47	0,61	0,48	0,50
iNOS, пмоль/мин/мг белка		-0,36	-0,47	-0,48	-0,37		-0,38		-0,31	-0,4
Суммарная NOS (cNOS+iNOS), пмоль/мин/мг белка		0,33		0,42	0,44	0,69	0,43	0,51	0,48	0,52
Нитрит-анион, пмоль/мг белка					-0,37	-0,52	-0,36	0,43		-0,39
Мочевина, нмоль/мг белка.						-0,51				
Аргиназа, пмоль/мин/мг белка	-0,43		-0,41	-0,37			-0,33		-0,42	
Редуктаза, нмоль/мин/мг белка								-0,38		
% нитрита	-0,46					-0,43		0,37		
% cNOS			0,40							
Аргиназа/NOS, усл.ед.	-0,64	-0,39								

Примечание: приведены только достоверные ($p \leq 0,05$) результаты корреляций; АЭ – амплитуда эндотелиальных колебаний, АМ – амплитуда миогенных колебаний, АН – амплитуда нейрогенных колебаний, АП – амплитуда пульсовых колебаний, АД – амплитуда пульсовых колебаний.

В пользу активации кальций-зависимых процессов в системе синтеза оксида азота, в частности, кальций-зависимого синтеза NO при ММ-воздействии свидетельствует выявление корреляционных связей между показателями синтеза NO и амплитудами миогенных колебаний в ЛДФ-грамме, являющихся отражением осцилляций концентрации ионов Ca^{2+} через мембранны мышечных клеток [4, 5] (табл. 1). Так, исходно выявлена прямая зависимость с суммарной NOS ($r=0,33$) ($p \leq 0,05$) и отрицательные связи ($p \leq 0,05$) с отношением аргиназа/ NOS ($r=-0,39$) и iNOS ($r=-0,36$), однако после ММ-воздействия усилились зависимости между NOS

($r=0,43$) и iNOS ($r=-0,38$) и появились новые: с нитритом ($r=-0,36$), аргиназой ($r=-0,33$) и самая сильная связь с кальций-зависимой cNOS ($r=0,47$). Следовательно, до ММ-воздействия наблюдалось доминирование активности аргиназного пути метаболизма оксида азота, а после ММ-воздействия – окислительного синтазного.

Таким образом, наличие сильных корреляционных связей и их динамика подтверждают данные [6, 7], что эндотелиальные клетки и их секретирующая NO функция являются главной мишенью для воздействия ЭМИ. Можно предположить прямое действие ММ-излучения на эндотелий сосудов и возникновение определенного резонанса между ММ-волнами и синтезом эндотелием NO.

NO функционирует в центральной и вегетативной нервной системах, участвуя в формировании длительных связей между нейронами и обеспечивая регулирующее действие вегетативной нервной системы и нейрогуморальную регуляцию функций организма. Показано, что NO-ergicическая система находится в тесной взаимосвязи со стресс-лимитирующими системами и ограничивает активность стресс-реализующих систем, в частности симпатоадреналовой системы [8, 9]. На уровне микроциркуляции именно с симпатическими адренергическими (в основном терморегуляторными) влияниями на гладкие мышцы артериол и артериолярных участков артерио-венулярных анастомозов [10, 11] связанны нейрогенные осцилляции тканевого кровотока, амплитуда которых при действии ММ-излучения увеличивается, что свидетельствует о снижении вазоконстрикции. Анализ корреляционных связей подтверждает NO-зависимость данного эффекта. Так, до ММ-воздействия достоверная ($p\leq 0,05$) корреляция наблюдалась с cNOS ($r=0,40$), аргиназой ($r=-0,41$), %cNOS ($r=0,40$) и iNOS ($r=-0,47$). После ММ-воздействия усилилась зависимость с cNOS ($r=0,61$), появились новые связи с нитритом ($r=0,43$), % нитрита ($r=0,37$), редуктазой ($r=-0,38$) и NOS ($r=0,51$) (табл. 1).

Рассматривая возможные пути увеличения активности NO под влиянием ММ-воздействия, выделяют три уровня реализации эффектов: непосредственное влияние на клетки – аутокринное действие; влияние на ткань в целом – паракринная регуляция деятельности соседних клеток и центральные эффекты – NO-зависимые изменения нервной и гуморальной регуляции [12]. Аутокринное и паракринное действие NO под влиянием ММ-волн находит свое отражение в модуляции амплитуд миогенных и эндотелиальных осцилляций микрокровотока и обусловлено выделением эндотелиальными клетками оксида азота, который диффундирует к миоцитам, где происходит активация гуанилаткиназы, ингибирование поступления ионов Ca^{2+} в цитоплазму и препятствует вазоконстрикции. О центральных NO-опосредованных эффектах ММ-излучения можно судить и по амплитудам дыхательных и пульсовых колебаний тканевого кровотока. Исследования динамики показателей корреляционного анализа системы синтеза оксида азота и пассивных факторов регуляции микроциркуляции (табл. 1) показал усиление исходных связей и отсутствие новых значимых зависимостей.

В целом, результаты исследования позволяют говорить о наличии достаточно тесной функциональной зависимости между микроциркуляторными процессами и характером функционирования системы синтеза оксида азота в организме человека.

Полученные в настоящем исследовании данные позволили констатировать не только важную роль оксида азота в реализации эффектов мм-воздействия, но и выделить специфику иерархической организации отдельных элементов данной системы, заключающейся в доминировании окисного пути синтеза NO при участии конститутивной NO-синтазы и восстановительным ресинтезом NO над аргиназным неокисным процессом деградации L-аргинина, поддерживающего высокие уровни генерации NO. Можно заключить, что 10-тикратное низкоинтенсивное мм-воздействие приводит к оптимизации функциональной активности системы синтеза оксида азота за счет использования циркулирующих пулов нитрит-аниона в крови в оксид азота, что явились существенно более логичным с физиологической точки зрения, поскольку подобная возможность синтеза NO не только из L-аргинина, но также из нитритных и нитратных ионов названа «безотходным воспроизведением этого физиологически активного соединения» [13] и, по-праву является одним из механизмов экономного использования источника NO, каким является L-аргинин и поддержания NO в пределах физиологической нормы. Особенностью данного биохимического пути превращения NO в организме млекопитающих является непосредственное участие в этом процессе гемсодержащих белков, находящихся в дезокси-форме [14, 15], таких как дезоксигемоглобина [16] и миоглобина [17].

Можно заключить, что 10-тикратное мм-воздействие изменяет и оптимизирует орнамент функциональных связей в системе синтеза оксида азота, при этом доминирующим в этой системе становится окислительный путь и активация конституционного *de novo* синтеза NO.

Настоящее исследование не только подтверждает литературные данные, но и значительно дополняет их сведениями о том, что одним из возможных механизмов действия мм-излучения на микрогемодинамику является изменения активности системы синтеза оксида азота.

ВЫВОД

Полученные в настоящем исследовании данные позволили выделить специфику иерархической организации отдельных элементов данной системы синтеза оксида азота, заключающейся в доминировании окисного пути синтеза NO при участии конститутивной NO-синтазы и восстановительным ресинтезом NO над аргиназным неокисным процессом деградации L-аргинина, поддерживающего высокие уровни генерации NO.

Список литературы

1. Чуян Е. Н. Влияние низкоинтенсивного электромагнитного излучения крайне высокой частоты на процессы микроциркуляции [Текст] / Е. Н. Чуян, Н. С. Трибрат // Ученые записки Таврического нац. ун-та им. В. И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2008. – Т. 21(60), № 1. – С. 156–168.
2. Механизмы действия низкоинтенсивного миллиметрового излучения на тканевую микрогемодинамику / Е.Н. Чуян, Н.С. Трибрат, М.Н. Ананченко, М.Ю. Раваева. – Симферополь. – 2011: Информ.-изд. отдел ТНУ им. В. И. Вернадского. - 324 с.
3. Раваева М.Ю.; Чуян Е.Н. Изменение активности системы синтеза оксида азота под действием низкоинтенсивного миллиметрового излучения // Ученые записки ТНУ им. В. И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2011. – Т. 24 (63), № 4. - С. 260-268.

4. Stefanovska A. Physics of the human cardiovascular system. / A. Stefanovska, M. Bracic // Contemporary Physics. – 1999. – V. 40, № 1. – P.31-35.
5. Мікроциркуляція в кардіології / [под ред. В.І. Маколкина]. – М., 2004. – 36с.
6. Okano H. Decreased plasma levels of nitric oxide metabolites, angiotensin II and aldosterone in spontaneously hypertensive rats exposed to 5 mT static magnetic field / H. Okano, H. Masuda, C. Ohkubo // Bioelectromagnetics. – 2005. – №26. – P. 161–172.
7. Киричук В.Ф. Оксид азота и микроциркуляторное звено системы гемостаза (обзор литературы) / В. Ф. Киричук, Е. А. Андронов, А. Н. Иванов, Н. В. Мамонтова // Успехи физиол. наук. — 2008. — Т. 39, № 4. — С. 83—91.
8. Paul V. A role of nitric oxide as an inhibitor of gamma-amonobutyric acid transaminase in rat brain. / V. Paul, A. Jayakumar // - Brain Res. Bull, 2000, v.51, p.43-46.
9. Armstead W.M. Nitric oxide contributes to opioid release from glia during hypoxia. / W.M. Armstead // - Brain Res. – 1998. – V. 813. – P. 398-401.
10. Крупакин А. И. Влияние симпатической иннервации на тонус микрососудов и колебания кровотока кожи / А. И. Крупакин // Физиология человека. – 2006. – Т. 32, № 5. – С. 95.
11. Active and passive modulation of cutaneous red cell flux as measured by Laser Doppler anemometry / H. Schmid – Schonbein, S. Zied, W. Rutten, H. Heidtmann // VASA . – 1992. – V.34. – P. 38-47.
12. Сосунов А.А. Оксид азота как межклеточный посредник // Соровский образовательный журнал. — 2000. — Т. 6. — С. 27-34. Киричук В.Ф., 2004
13. Реутов В.П. Оксид азота (NO) и цикл NO в миокарде: молекулярные, биохимические и физиологические аспекты / В. П. Реутов, В. Е. Охотин, А. В. Шуклин и др. // Успехи физиол. наук. – 2007. – Т. 38, № 4. – С. 39–58.
14. Реутов В.П. Проблема оксида азота в биологии и медицине и принцип цикличности: ретроспективный анализ идей принципов и концепций. / В.П. Реутов, Е.Г. Сорокина, Н.С. Косицьин, В.Е. Охотин // М.: Едиториал УРСС, 2003. 96 с.
15. Реутов В.П. Цикл оксида азота в организме млекопитающих и принцип цикличности / В.П. Реутов // Біохімія. – 2002. – Т.67. №3. – С. 353-376.
16. Генерація оксида азота при окисленні ферро-форми гемоглобіна нітритом / І. І. Степуро [и др.] // Біохімія. – 1997. – Т. 62, № 9. – С. 1122–1129.
17. Стародуб Н.Ф. Миоглобін: структура, властивості, синтез біологіческа роль. / Н.Ф. Стародуб, В.Н. Коробов, В.И. Назаренко // Київ: Наук. Думка, 1992. 284 с.

Раваєва М.Ю. Роль оксиду азоту в реалізації мікроваскулярних ефектів низькоінтенсивного міліметрового випромінювання // М.Ю. Раваєва // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2012. – Т. 25 (64), № 3. – С. 165-170.

У статті розглянуто вплив низькоінтенсивного міліметрового випромінювання на систему синтезу оксиду азоту. Кореляційний аналіз показників мікроциркуляції та системи синтезу оксиду азоту показав, що 10-разова дія низькоінтенсивним міліметровим випромінюванням призводить до оптимізації функціональної активності системи синтезу оксиду азоту за рахунок використання циркулюючих пулів нітрит-аніону в крові до оксиду азоту.

Ключові слова: міліметрове випромінювання, мікроциркуляція.

Ravaeva M.Y. The role of nitric oxide in the implementation by microvascular effects of millimeter radiation low intensity // M.Y. Ravaeva // Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No 3. – P. 165-170.

The article is considered the impact of low-intensity millimeter radiation on the system of nitric oxide synthesis. Correlation analysis of microcirculation parameters and nitric oxide showed that the 10-fold effect by millimetric radiation low intensity leads to the optimization of the functional activity of nitric oxide synthesis by the use of the pool circulating of nitrite anion in blood to nitric oxide.

Keywords: millimeter radiation, microcirculation.

Поступила в редакцию 17.09.2012 г.

УДК 574.4+595.78:582.632.2

**ВЛИЯНИЕ СОДЕРЖАНИЯ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ В ЛИСТЬЯХ ДУБА
ПУШИСТОГО НА СОСТАВ МИКРОСООБЩЕСТВА НАСЕКОМЫХ-
ФИТОФАГОВ**

Савушкина И.Г.

*Таврический национальный университет им. Вернадского, Симферополь, Украина
E-mail: limodorum2001@rambler.ru*

Приведены результаты изучения влияния содержания микроэлементов (Cu, Zn, Bb, Cd) в листьях деревьев дуба пушистого на состав микросообществ листогрызущих насекомых, населяющих эти растения. Установлено, что плотность семи из тринадцати видов насекомых-фитофагов весенне-летнего комплекса достоверно коррелирует с содержанием тяжелых металлов в листьях.

Ключевые слова: дуб пушистый, микросообщество, листогрызущие насекомые, микроэлементы, тяжелые металлы.

ВВЕДЕНИЕ

Индивидуальная консорция представляет собой живой объект и характеризуется определенным химизмом и в том числе и микроэлементным составом. Среди всех микроэлементов особое место занимают тяжелые металлы. С одной стороны они являются серьезными загрязнителями среды, а с другой – важным фактором регуляции целого ряда ферментных систем [1–3]. Для нормальной жизнедеятельности живых организмов тяжелые металлы, и просто металлы, необходимы, так как они являются составной частью биологических комплексов в качестве лиганда, функционирование которых нуждается в присутствии того или иного металла, либо в реакционном центре белка-фермента, либо для образования хелатного соединения биологически активного комплекса.

Данные о микроэлементном составе растений, в том числе о содержании тяжелых металлов, довольно широко представлены в научной литературе [2–8 и др.]. Однако чаще всего анализ характера накопления элементов растениями проводится без учета их индивидуальности, путем использования усредненной пробы. Что же касается влияния содержания микроэлементов в отдельных растениях на комплекс листогрызущих насекомых, питающихся их листвой, то этот вопрос остается до настоящего времени открытым. Перспективным направлением исследований является изучение влияния микроэлементов на насекомых на уровне индивидуальной консорции. Так как именно на этом уровне осуществляется взаимодействие, адаптация детерминанта и его консортов. Центральный организм консорции (детерминант) определяет характер среды обитания для организмов-консортов. Ядро консорции оказывает на консортов различных концентров

непосредственное и опосредованное влияние и является фактором их естественного отбора [9, 10].

Целью работы было изучение влияния содержания микроэлементов (Cu, Zn, Bb, Cd) в листьях деревьев дуба пушистого на состав микросообществ листогрызущих насекомых, населяющих эти растения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на постоянной пробной площади «Лавровое», расположенной на южном макросклоне Главной гряды Крымских гор в зоне сухих субтропиков в 2 км от села Лавровое Алуштинского района. Участок расположен в пределах нижнего лесостепного пояса южного макросклона. Растительность представлена формацией дуба пушистого – *Querceta pubescens*. Тип леса – сухая грабинниковая дубрава. Рельеф местности имеет овражнобалочный характер. Пробная площадь состоит из двух парцелл – юго-западной и северо-восточной экспозиций, разделенных неглубоким оврагом.

В качестве модельных деревьев было выбрано четырнадцать деревьев дуба пушистого (*Quercus pubescens* Willd.), произрастающих на склоне юго-западной экспозиции. Насекомых-фитофагов брали из природных популяций на фазе личинок. Сборы и подсчет личинок проводили отдельно на каждом из модельных деревьев. Определение собранных особей проводили, используя соответствующие руководства [11; 12; 13].

Листья с модельных деревьев собирали одновременно с подсчетом плотности личинок. Воздушно-сухие листья измельчали, проводили минерализацию методом сухого озоления и определяли концентрации микроэлементов (меди, цинка, свинца и кадмия) атомно-абсорбционным методом в пламени ацетилен воздух [14] на приборах AAS-3 и Hitachi Z-700. Анализ выполняли в трехкратной повторности и данные обрабатывали с использованием стандартных статистических методов. Содержание элементов пересчитывали в мг/кг массы воздушно-сухого вещества.

Для математической обработки полученных результатов использовали стандартные статистические процедуры с использованием возможностей программы MS Excel-XP.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Весенне-летний комплекс листогрызущих насекомых в индивидуальных консорциях дуба пушистого в пределах пробной площади включает 13 видов с доминированием по численности зеленой дубовой листовертки (*Tortrix viridana* L.). Менее часто встречаются: совка ранняя желто-бурая (*Orthosia cerasi* Fab.), угловатая пяденица южная (*Ennomos quercaria* Hb.), зимняя пяденица (*Operophtera brumata* L.) и красновато-серый дубовый коконопряд (*Eriogaster rimicola* Hb.). Эти виды имели достаточно высокую плотность, но встречались не на всех деревьях. К видам отмеченным более чем на половине деревьев, но имевшим невысокую плотность относятся непарный шелкопряд (*Lymantria dispar* L.), совка ранняя буро-серая (*Orthosia gothica* L.), грабовая огневка (*Agrotera nemoralis* Sc.) и хохлатая пяденица

(*Colotois pennaria* L.). Редко в исследуемых микросообществах встречались дубовая палевая листовертка (*Tortrix loeflingiana* L.), златогузка (*Euproctis chrysorrhoea* L.), пяденица обдирала (*Erannis defoliaria* L.) и дубовая хвостатка (*Thecla ilicis* Esp.).

Совместный анализ данных по содержанию микроэлементов (цинка, меди, свинца и кадмия) в листьях дуба и плотности личинок насекомых фитофагов показал наличие ряда достоверных корреляционных связей. Так плотность личинок зеленой дубовой листовертки на дереве оказалась негативно связанной с содержанием меди ($R = -0,56$; $d.f. = 12$; $P < 0,05$). Аналогичную закономерность в уменьшении плотности личинок с ростом содержания этого микроэлемента показали совка ранняя буро-серая ($R = -0,65$; $d.f. = 12$; $P < 0,05$) и зимняя пяденица ($R = -0,61$; $d.f. = 12$; $P < 0,05$) (рис. 1). При этом, содержание меди в листьях деревьев колебалось от 5,1 до 13,6 мг/кг.

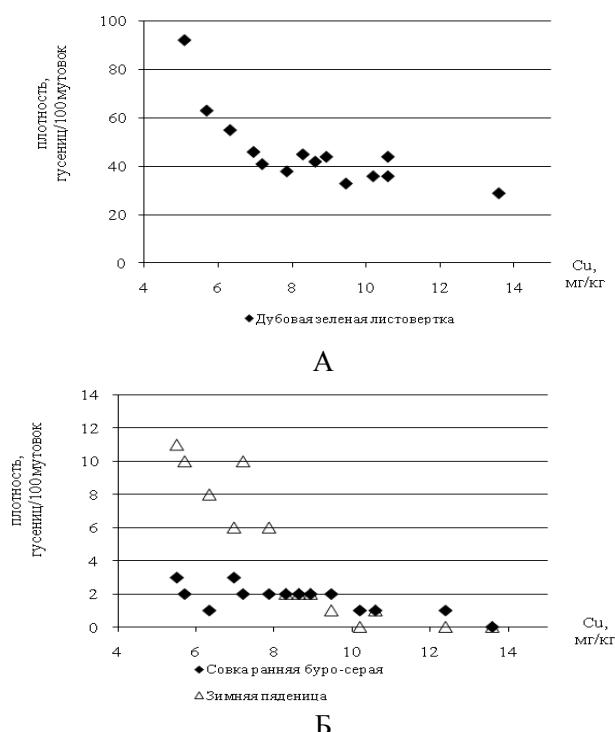


Рис. 1. Зависимость плотности личинок зеленой дубовой листовертки (А), совки ранней буро-серой и зимней пяденицы (Б) от содержания меди в листьях

По цинку достоверные корреляционные связи были найдены для совки ранней желто-буровой, совки ранней буро-серой и зимней пяденицы (рис.2). Но, если для первого вида характерна положительная корреляционная связь ($R = 0,56$; $d.f. = 12$; $P < 0,05$), то для двух остальных видов связь имеет обратное направление. Наиболее тесная отрицательная корреляция обнаружилась у личинок зимней пяденицы ($R = -0,76$; $d.f. = 12$; $P < 0,01$) и несколько слабее у совки ранней буро-серой ($R = -0,55$; $d.f.$

= 12; $P < 0,05$). Интервал значений содержания цинка у отдельных деревьев отличается почти в два раза (от 11,7 до 22,1 мг/кг).

Кроме того, совка ранняя буро-серая и зимняя пяденица показали тесную обратную корреляционную связь с суммарным содержанием меди и цинка в листьях: $R = -0,65$ и $R = -0,76$ – соответственно.



Рис. 2. Зависимость плотности личинок совки ранней желто-буровой, совки ранней буро-серой и зимней пяденицы от содержания цинка в листьях

Что касается свинца, то как оказалось, его содержание влияет на плотность большего количества видов, чем остальные три микроэлемента. Чувствительность к содержанию этого элемента обнаружили четыре вида листогрызущих насекомых, входящих в состав микросообщества (рис. 3). При этом отрицательная достоверная корреляция была отмечена только для плотности личинок грабовой огневки ($R = -0,58$; $d.f. = 12$; $P < 0,05$). Плотность же личинок совки ранней желто-буровой, хохлатой пяденицы и угловатой пяденицы южной возрастает с увеличением содержания этого элемента. Наиболее тесная положительная корреляция характерна для плотности угловатой пяденицы южной ($R = 0,74$; $d.f. = 12$; $P < 0,01$) и хохлатой пяденицы ($R = 0,61$; $d.f. = 12$; $P < 0,05$), для совки она менее значительна, но все же статистически достоверна ($R = 0,57$; $d.f. = 12$; $P < 0,05$). Следует упомянуть, что при этом содержание свинца в листьях деревьев колебалось от 0,46 до 1,12 мг/кг и, таким образом, деревья по концентрации этого элемента отличались примерно в 2 раза.

Для трех видов личинок была отмечена достоверная положительная корреляция с содержанием в листьях кадмия, содержание которого колебалось от 0,035 до 0,095 мг/кг (рис. 4). Наиболее чувствительными к повышению этого элемента оказались личинки угловатой пяденицы южной ($R = 0,90$; $d.f. = 12$; $P < 0,01$). Для двух других видов – совки ранней желто-буровой и хохлатой пяденицы – коэффициенты корреляции составили 0,57 и 0,65 соответственно.

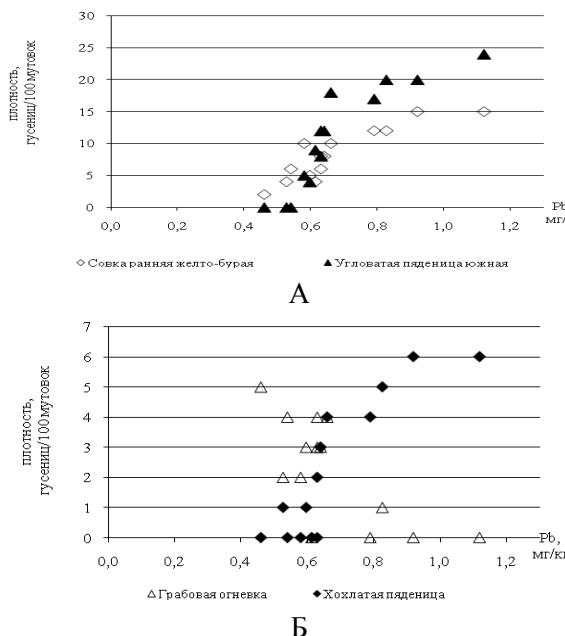


Рис. 3. Зависимость плотности личинок совки ранней желто-буровой, угловатой пяденицы южной (А), грабовой огневки и хохлатой пяденицы (Б) от содержания свинца в листьях

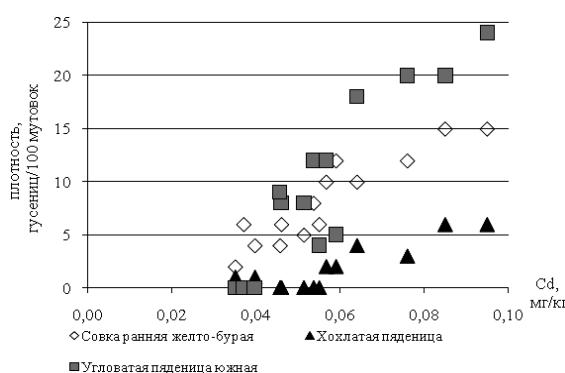


Рис. 4. Зависимость плотности личинок совки ранней желто-буровой, угловатой пяденицы южной и хохлатой пяденицы от содержания кадмия в листьях

Таким образом, из тринадцати видов насекомых для семи установлены достоверные корреляционные связи между плотностью личинок и изменением содержания цинка, меди, свинца и кадмия в листьях. Для таких видов как непарный шелкопряд, красновато-серый дубовый коконопряд, пяденица обдирало, дубовая палевая листовертка, дубовая хвостатка и златогузка достоверных корреляций между их плотностью и содержанием микроэлементов не установлено. Интересным

представляется тот факт, что среди видов обнаруживших корреляцию можно выделить две группы в зависимости от того положительная или отрицательная корреляционная связь. К первой группе можно отнести виды, плотность которых уменьшается с увеличением содержания тяжелого металла. В эту группу вошли зеленая дубовая листовертка, совка ранняя буро-серая, грабовая огневка и зимняя пяденица (рис. 1–3). Во вторую группу входят такие виды как совка ранняя желто-бурая, хохлатая пяденица и угловатая пяденица южная, для которых, наоборот, характерно увеличение плотности с увеличением концентрации микроэлементов (рис. 2–4).

Обобщенная матрица корреляционных связей, характеризующая ассоциации видов в микросообществах индивидуальных консорций дуба и содержанием микроэлементов представлена в табл. 1.

Таблица 1
Значения коэффициентов корреляции между плотностью видов в микросообществах индивидуальных консорций дуба и содержанием тяжелых металлов в листьях

Микроэлемент Вид фитофага	Cu	Zn	Pb	Cd	Cu+Zn
Зеленая дубовая листовертка	-0,56*	-0,16	-0,03	-0,06	-0,37
Непарный шелкопряд	-0,12	0,03	-0,06	-0,07	-0,04
Совка ранняя желто-бурая	0,07	0,56*	0,57*	0,57*	0,38
Совка ранняя буро-серая	-0,65*	-0,55*	-0,14	-0,09	-0,65*
Красновато-серый дубовый коконопряд	0,12	-0,14	0,17	-0,01	-0,03
Грабовая огневка	-0,14	-0,28	-0,58*	-0,38	-0,24
Зимняя пяденица	-0,61*	-0,76**	0,18	-0,02	-0,76**
Пяденица обдирало	0,13	0,03	-0,18	-0,24	0,08
Хохлатая пяденица	-0,13	0,10	0,61*	0,65*	0,00
Угловатая пяденица южная	0,02	0,29	0,74**	0,90**	0,19
Дубовая палевая листовертка	-0,03	0,20	-0,35	-0,13	0,11
Златогузка	0,09	0,11	-0,02	-0,32	0,11
Дубовая хвостатка	0,13	-0,17	-0,11	-0,24	-0,05

Примечание: достоверные корреляционные связи выделены жирным шрифтом

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$

В тоже время, можно отметить и закономерности влияния отдельных элементов на колебания плотности видов с достоверной корреляционной связью. Так медь, несмотря на относительно невысокие концентрации, оказывает негативное влияние на плотность видов в микросообществе (рис. 1). Вместе с тем противоположные закономерности характерны для такого сильнотоксичного элемента как кадмий. Во всех вариантах повышение его содержания сопряжено с увеличением плотности видов (рис. 4). В отношении содержания цинка и свинца таких четких закономерностей не обнаружено.

Полученные данные позволяют говорить о наличии определенных отношений между аккумуляцией микроэлементов в листьях и составом микросообщества насекомых, обитающих на дереве. Обнаруженные связи позволяют предположить способность отдельных видов насекомых-фитофагов к избирательности в отношении содержания химических элементов в листьях их кормовых растений.

ВЫВОДЫ

1. Плотность семи из тринадцати видов насекомых-фитофагов достоверно коррелирует с изменением содержания цинка, меди, свинца и кадмия в листьях дуба пущистого.
2. Уменьшение плотности личинок с увеличением содержания микроэлементов отмечено для зеленой дубовой листовертки, совки ранней буро-серой, грабовой огневки и зимней пяденицы. Увеличения плотности с ростом концентрации элементов характерно для совки ранней желто-буровой, хохлатой пяденицы и угловатой пяденицы южной.
3. На колебание плотности видов концентрация меди оказывает негативное, а кадмия положительное влияние. Для свинца и цинка четких закономерностей не обнаружено.
4. Выявленные связи указывают на способность отдельных видов насекомых-фитофагов к избирательности в отношении содержания химических элементов в листьях их кормовых растений.

Список литературы

1. Войнар А.И. Биологическая роль микроэлементов в организме животных и человека / А.И. Войнар. – М. : Высшая школа, 1960. – 544 с.
2. Кабата-Пендиас А.. Микроэлементы в почвах и растениях / А. Кабата-Пендиас, Х. Пендиас. – М. : Мир, 1989. – 439 с.
3. Школьник М.Я. Микроэлементы в жизни растений / М.Я. Школьник. – Л. : Наука, 1980. – 278 с.
4. Бессонова В.П. Морфо-функциональные исследования растений в условиях загрязнения среды тяжелыми металлами: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня д-ра біол. наук: спец. 03.00.16 "Екологія" / В.П. Бессонова. – Днепропетровск, 1991. – 36 с.
5. Биогеоценотический покров Бескид и его динамические тенденции / [М.А. Голубец, Д.В. Борсук, М.В. Гаврилюк и др.] ; под ред. М.А. Голубца. – Киев : Наук. думка, 1983. – 240 с.
6. Ильин В.Б. Элементный химический состав растений / В.Б. Ильин. – Новосибирск : Наука, 1985. – 129 с.
7. Ильин В.Б. Тяжелые металлы в системе почва-растение / В.Б. Ильин. – Новосибирск : Наука, 1991. – 151 с.

8. Цветкова Н.Н. Особенности миграции органо-минеральных веществ и микроэлементов в лесных биогеоценозах степной Украины / Н.Н. Цветкова. – Днепропетровск: Изд-во ДГУ, 1992. – 238 с.
9. Івашов А.В. Консортівні зв'язки зеленої дубової листовійки (*Tortrix viridana* L.): теоретичні і прикладні аспекти : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня д-ра біол. наук: спец. 03.00.16 "Екологія" / А.В. Івашов. – Дніпропетровськ, 2001. – 36 с.
10. Ivashov A.V. The role of host plant phenology in the development of the oak leafroller moth, *Tortrix viridana* L. (*Lepidoptera: Tortricidae*) / A.V. Ivashov, G.E. Boyko, A.P. Simchuk // Forest Ecology and Management. – 2002. – Vol. 157. – P. 7–14.
11. Гусев В.И. Определитель повреждений лесных, декоративных и плодовых деревьев и кустарников / В.И. Гусев. – М. : Лесн. пром-сть, 1984. – 472 с.
12. Ильинский А.И. Определитель вредителей леса / А.И. Ильинский. – М. : Сельхозгиз, 1962. – 392 с.
13. Мамаев Б.М. Определитель насекомых по личинкам / Б.М. Мамаев. – М. : Просвещение, 1972. – 400 с.
14. Методические указания по определению тяжелых металлов в почвах сельхозугодий и продукции растениеводства / Госагропром СССР, Центр. ин-т агрохим. обслуживания с.-х. (ЦИНАО) – М. : 1989. – 64 с.

Савушкіна І.Г. Вплив вмісту мікроелементів у листках дуба пухнастого на склад мікроуруповання комах-фітофагів / І.Г. Савушкіна // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2012. – Т. 25 (64), № 3. – С. 171-178.

Наведено результати вивчення впливу вмісту мікроелементів (Cu, Zn, Bb, Cd) у листках дерев дуба пухнастого на склад мікроуруповань листогризучих комах, що населяють ці рослини. Встановлено, що щільність семи з тринадцяти видів комах-фітофагів весняно-літнього комплексу достовірно корелює із вмістом важких металів у листках.

Ключові слова: дуб пухнастий, мікроуруповання, листогризучі комахи, мікроелементи, важкі метали.

Savushkina I.G. The microelements content in the leaves of pubescent oak influence on the composition of microcommunity phytophagous insects / I.G. Savushkina // Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No 3. – P. 171-178.

There is results of study of the microelement content (Cu, Zn, Bb, Cd) in the leaves of pubescent oak trees influence on the composition microcommunities herbivorous insects inhabiting these plants. Found that the density seven of the thirteen species of phytophagous insects spring-summer complex is significantly correlated with the content of heavy metals in the leaves.

Keywords: pubescent oak, microcommunity, herbivorous insects, microelement, heavy metals.

Поступила в редакцию 24.09.2012 г.

УДК 581.131

ВПЛИВ УМОВ МІНЕРАЛЬНОГО ЖИВЛЕННЯ НА ЗМІНИ АНТИОКСИДАНТНОГО СТАТУСУ РОСЛИН ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ

Сандецька Н.В.¹, Каменчук О.П.¹, Ситар О.В.²

¹*Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України, Київ, Україна*

²*Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна*

E-mail: Isnv@ukr.net

Досліджено активність глутатіонредуктази, глутатіонпероксидази, супероксиддисмутази, вміст малонового диальдегіду та SH-груп в 14-добових рослинах пшениці за дії позакореневої обробки різними концентраціями сульфату та ортофосфату. Виявлено зміни у антиоксидантному статусі рослин за позакореневої обробки мінеральними добривами.

Ключові слова: озима пшениця, позакореневе підживлення, SH-групи, глутатіонредуктаза, глутатіонпероксидаза, малоновий диальдегід, супероксиддисмутаза.

ВСТУП

Одним із ключових завдань землеробства є підвищення продуктивності культурних рослин. Тісна залежність врожайності зернових та інших сільськогосподарських культур від рівня застосування мінеральних добрив доведена багаторічним досвідом ведення землеробства [1, 2].

Удосконалення технологій вирощування, збалансування систем живлення, досягнення високих коефіцієнтів засвоєння елементів живлення є важливими складовими підвищення врожайності, поряд зі створенням нових сортів із високим генетичним потенціалом продуктивності [2].

Розробка нових підходів до регулювання і розкриття потенціалу продуктивності сільськогосподарських рослин має стратегічне значення для рослинництва. Одним із таких підходів є дослідження регуляції субстрат-ферментних взаємодій і методи діагностики ферментативної активності рослинної тканини або органу. В якості такого показника нами запропоновано дослідження вмісту сульфігідрильних груп, що може мати діагностичну цінність при дослідженні змін вмісту ферментів прооксидантно-антиоксидантної системи захисту. Каталітична роль сульфігідрильних груп (SH-груп), ферментів добре відома.

Величини концентрацій аніонів – ортофосфату і сульфату в рослинах можуть суттєво впливати на кількість SH-груп. Фосфор в більшості ґрунтів світу міститься у важкодоступній мінеральній та органічній формі. Його концентрація в ґрунтовому розчині зазвичай низька (від 2 до 10 мкМ). Він є одним із важкодоступних ґрутових макроелементів, який може лімітувати врожайність рослин. Ускладнює засвоювання фосфору рослинами також низька швидкість його дифузії в ґрунті:

вона складає всього від 10-12 до 10-15 м/с, внаслідок чого прикоренева зона рослин швидко виснажується [3]. Велика частина необхідної рослинам сірки поглинається корінням у формі сульфату (SO_4^{2-}). Сірка включається в амінокислоти цистеїн, цистин і метіонін, фосфор - в аденоцитидинтрифосфат (АТФ) та інші аденоинфосфати, що грають ключову роль в енергетичному обміні клітини, а також в фосфоліпіди клітинних мембрани та в нуклеїнові кислоти [4]. Сірка підвищує ефективність використання інших поживних речовин рослинами, насамперед азоту і фосфору. Найчастіше дефіцит сульфатів спостерігається на глинистих і суглинистих ґрунтах. Дефіцит елементу зростає за умов внесення сечовини, аміачної селітри, діамонійфосфату, аміачної води і безводного аміаку тощо. Перераховані добрива містять сірку в малих кількостях або взагалі її не містять [5].

Таким чином, метою нашої роботи було простежити залежність між рівнем сульфігідрильних груп у органах пшениці, вмістом малонового диальдегіду та активності супероксиддисмутази, глутатіонредуктази та глутатіонпероксидази в залежності від умов позакореневого підживлення сіркою та фосфором.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Рослини озимої пшениці сорту Смуглянка вирощували методом водної культури в лабораторних умовах на середовищі Хогленда-Арнона (Х-А).

Середовище Хогленда-Арнона розчиняли водою 1:10 та використовували у дослідах. Проростки озимої пшениці у фазі двох листків обробляли шляхом занурення листків у розчини на 5 хв при 23 °C за наступною схемою: 1 - 1/10 Х-А (контроль); 2 - 1/10 Х-А + позакоренева обробка K_2SO_4 (1,0 мкМ); 3 - 1/10 Х-А + позакоренева обробка K_2SO_4 (0,1 мМ); 4 - 1/10 Х-А + позакоренева обробка KH_2PO_4 (10 мкМ); 5 - 1/10 Х-А + позакоренева обробка KH_2PO_4 (100 мкМ); 6 - 1/10 Х-А + позакоренева обробка K_2SO_4 (1,0 мкМ) + KH_2PO_4 (10 мкМ).

Рослини озимої пшениці на 7 день після позакореневої обробки використовувалися для визначення кількості сульфігідрильних груп, глутатіонредуктази, супероксиддисмутази та вмісту малонового діальдегіду. Кількість сульфігідрильних груп визначали за методикою Велча і Норвела [6].

Активність глутатіонпероксидази (ГП) визначали за методом Pinto R.E. та Bartley W. [7] в модифікації Кругликової Г.А. та Штутман Ц.М. [8]. В якості окислювального субстрату використовували пероксид водню. Активність оцінювали за різницю між кількістю відновленого глутатіону в контрольній пробі (без H_2O_2) та дослідній [9].

Для визначення активності СОД (КФ 1.15.1.1) використовували спеціальний кіт для визначення активності СОД (SOD Assay Kit-WST, Sigma-Aldrich). Рослинні клітини мають кілька форм СОД. Зокрема, нами був проведений аналіз цитозольної фракції ферменту. Наважку листків гомогенізували в 50 мМ калій-фосфатного буфера, pH 7,8. Гомогенат центрифугували, а супернатант використовували як грубий екстракт цитозольної фракції СОД. Оптичну щільність вимірювали при 450 нм.

Активність ГР (КФ 1.6.4.2) визначали спектрофотометрично по зменшенню оптичної щільноті при довжині хвилі 340 нм в результаті окиснення НАДФ*Н в присутності окисненого глутатіону [10]. Реакційне середовище містило 100 мМ

фосфатного буфера (рН 7,8), 1 мМ EDTA, 0,2 мМ НАДФН та 0,5 мМ окисненого глутатіону. Вимірювання оптичної щільності проводили протягом 10 хв. Активність ферменту ро зраховували в мкМ / (мг х хв) на основі коефіцієнта молярної екстинкції $\varepsilon = 6,2 \text{ мМ}^{-1} \text{ х см}^{-1}$.

Результати оброблені статистично за допомогою програми Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Кількісне визначення вмісту сульфідрильних груп у коренях озимої пшениці показало, що їх вміст залежить від концентрації сірки та фосфору в поживному розчині. Обробка різними концентраціями сульфату і ортофосфату призводила до збільшення вмісту SH-груп в коренях озимої пшениці (рис. 1).

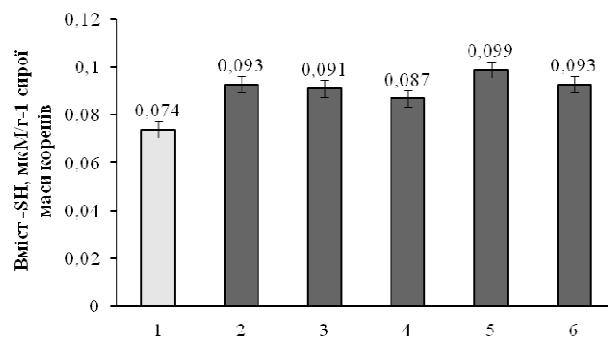


Рис. 1. Вплив позакореневої обробки різними концентраціями сульфату та ортофосфату на вміст SH-груп в коренях озимої пшениці сорту Смугланка.
Умовні позначки тут і далі: 1 - 1/10 X-A; (контроль) 2 - 1/10 X-A + K₂SO₄ (1,0 мкМ); 3 - 1/10 X-A + K₂SO₄ (0,1 мкМ); 4 - 1/10 X-A + KH₂PO₄ (10 мкМ); 5 - 1/10 X-A + KH₂PO₄ (100 мкМ); 6 - 1/10 X-A + K₂SO₄ (1,0 мкМ) + KH₂PO₄ (10 мкМ).

Згідно з отриманих даних, позакоренева обробка KH₂PO₄ (100 мкМ) призводила до збільшення вмісту SH-груп на 34%; обробка K₂SO₄ (1,0 мкМ), K₂SO₄ (1,0 мкМ) + KH₂PO₄ (10 мкМ) – на 26%; а обробка KH₂PO₄ (10 мкМ) – на 18%. Максимальний ефект спостерігався за позакореневої обробки 100 мкМ KH₂PO₄, що в даному випадку може свідчити про підвищення ферментативної активності в тканинах кореня.

Також паралельно було досліджено вміст SH-груп в листках рослин пшениці (рис. 2). Показано, що в листках порівняно з коренями вміст SH-груп був меншим, але було відмічено тенденцію до більшої величини зростання вмісту SH-груп за дії добрив.

Дані по вмісту SH-груп в листках варіанту з обробкою KH₂PO₄ (100 мкМ) буливищими за контрольні значення на 21%, а у варіанті K₂SO₄ (1,0 мкМ) + KH₂PO₄ (10 мкМ) вміст SH-груп зростав на 18% порівняно з контролем. Відомо, що зростання вмісту SH-груп за дії певного антропогенного чинника є захисною реакцією при розвитку оксидного стресу. Так, зростання вмісту сполук тіолової природи, що

містять SH-групи та фенолів, флавоноїдів, проліну, а також активності супероксиддисмутази, пероксидази було показано за умов дії ультрафіолетового опромінення та нікелю [11].

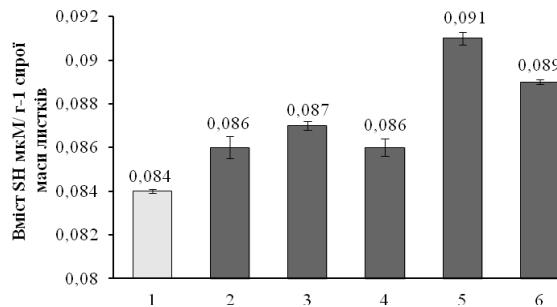


Рис. 2. Вплив позакореневої обробки різними концентраціями сульфату та ортофосфату на вміст SH-груп в листках озимої пшениці сорту Смуглянка.

Відомо, що у структурі глутатіону знаходиться більша частину пулу вільних тіолових груп у біологічних системах. Відновлений глутатіон є основним водорозчинним антиоксидантом в процесах фотосинтезу і в нефотосинтетичних тканинах, реагує прямо або опосередковано з активними формами кисню, сприяє цілісності клітинних структур і певним функціям різних метаболічних шляхів [12, 13].

Для підтвердження нашого припущення стосовно підвищення ферментативної активності в фотосинтетичних тканинах за умов дії сульфату та ортофосфату було досліджено активність глутатіонредуктази, глутатіонпероксидази (рис. 3, 4).

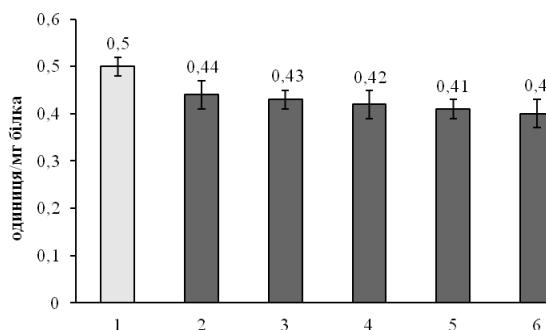


Рис. 3. Вплив позакореневої обробки різними концентраціями сульфату та ортофосфату на активність глутатіонпероксидази в листках озимої пшениці сорту Смуглянка.

Як і в тканинах кореня, так і в листках показано зниження активності глутатіонпероксидази, що в свою чергу пов'язано зі зростанням вмісту SH-груп. Відомо, що важлива функція глутатіону полягає в детоксикації при оксидному стресі: глутатіон є косубстратом для глутатіонпероксидази при захисній реакції для

зниження вмісту гідроперекисів при окислювальному стресі [14]. Тому, в нашому експерименті ми спостерігали значне зростання вмісту SH-груп як в листках, так і в коренях за позакореневої обробки. Суттєве зростання було відмічено при позакореневій обробці з K_2SO_4 , тому додаткове підживлення сіркою у формі K_2SO_4 може як сприяти підвищенню вмісту SH-груп, так і створює умови для розвитку оксидного стресу, який в свою чергу може забезпечити предадаптацію для рослин пшениці за даних умов.

Крім того, ГР є ферментом, що каталізує НАДФН-залежне відновлення окисненого глутатіону і підтримує його внутрішньоклітинний пул у відновленому стані [15]. Утилізація H_2O_2 , що утворюється в хлоропластах, забезпечується ферментом глутатіонредуктазою, що здійснює НАДФН-залежне відновлення окисненого димерного глутатіону [16]. Було показано, що індукція ГР в рослинах відбувається в різних стресових умовах [17]. В експериментах Tsai [18] відзначено збільшення активності ГР в коренях рису у відповідь на дію $NaCl$. Дослідження Dixit [19] показали подібні залежності при обробці рослин гороху кадмієм. Зростання активності ГР спостерігали і в рослинах пшениці за обробки різними концентраціями сульфату та ортофосфату (рис. 4). Наведені результати дозволяють припустити, що різні стресові фактори, до яких можна віднести позакореневу обробку мінеральними добривами, можуть викликати в рослинах подібні процеси.

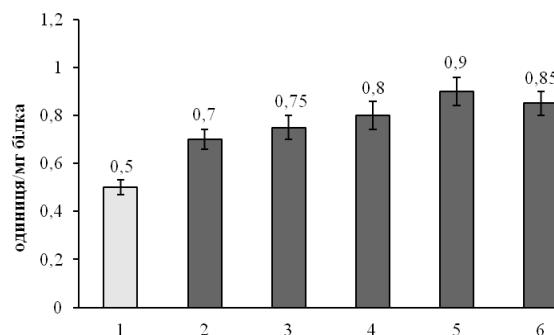


Рис. 4. Вплив позакореневої обробки різними концентраціями сульфату та ортофосфату на активність глутатіонредуктази в листках озимої пшениці сорту Смуглянка.

Поряд з цим, вивчення маркеру оксидного стресу – вмісту малонового диальдегіду та активності ферменту СОД продемонструвало тенденцію до зростання вмісту МДА у всіх досліджуваних варіантах (рис. 5).

Дане зростання свідчить про розвиток оксидного стресу і, на нашу думку, оксидний стрес при позакореневій обробці мінеральними добривами (сірка та фосфор) може являти собою явище предадаптації, оскільки активно функціонує проантиоксидантна система і паралельно зростає вміст SH-груп, а змін у вмісті антиоксидантного ферменту СОД відмічено не було (рис. 6).

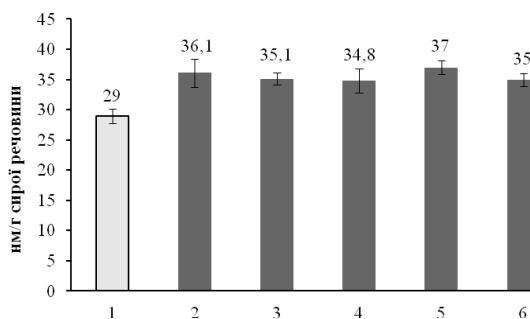


Рис. 5. Вплив позакореневої обробки різними концентраціями сульфату та ортофосфату на вміст малонового диальдегіду (МДА) в листках озимої пшениці сорту Смуглянка.

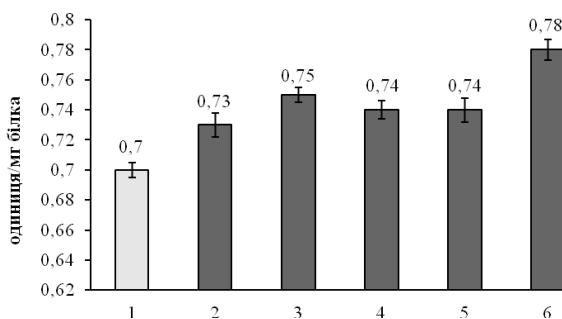


Рис. 6. Вплив позакореневої обробки різними концентраціями сірки та фосфору на активність супероксиддисмутази в листках озимої пшениці сорту Смуглянка.

СОД є одним із ключових ферментів системи захисту клітин і тканин від окислювальної деструкції. Вона каталізує реакцію дисмутації супероксидного аніону радикалу (O_2^-) до O_2 та H_2O_2 , регулюючи таким чином внутрішньоклітинну концентрацію вільних радикалів кисню. Активність СОД за дії несприятливих факторів навколошнього середовища, при збільшенні утворення активних форм кисню у організмах рослин, може змінюватися диференційовано в залежності від тривалості й інтенсивності дії стресового чинника, а також від стійкості організму, стадії розвитку рослин тощо [20]. Результати детектування змін активності СОД не показали статистично достовірних змін величин, що на фоні зростання активності ГР та вмісту SH-груп може свідчити про більшу активність прооксидантної системи захисту.

Зростання активності ГР та незначні зміни у вмісті СОД, що були визначені у рослин пшениці, також було відмічено при інфікуванні рослин нуту *Cicer arietinum* L. Нановірусами з подальшим розвитком оксидного стресу [21]. Для фітостресу є характерною активація основних антиоксидантних ферментів та збільшення пулу низькомолекулярних антиоксидантів на фоні зростання їх окиснення [22, 23]. Поряд з цим, у рослин гороху за умов дії гіпертермії, екзогенного пероксиду водню було

виявлено обмеження активності глутатіонредуктази при оксидному стресі і зроблено припущення про різні механізми відповіді антиоксидантної системи хлоропластів на дію різних абіотичних факторів [24].

ВИСНОВОК

Показано, що позакоренева обробка сульфатом та ортофосфатом 14-денних проростків озимої пшениці сорту Смуглянка призводить до збільшення вмісту SH-груп в коренях та листках. Найбільш сильний ефект дала обробка KH_2PO_4 (100 мкМ), при якій вміст сульфгідрильних груп у коренях та листках підвищувався на 34%. Встановлені зміни вмісту SH-груп в коренях та листках проростків озимої пшениці можуть слугувати основою для фізіологічного обґрунтування систем живлення культури на початкових фазах розвитку. Виявлено наявність розвитку оксидного стресу при позакореневій обробці мінеральними добривами (сірка та фосфор), що може являти собою явище предадаптації, оскільки активно функціонує проантиоксидантна система і паралельно зростає вміст SH-груп, а змін у вмісті антиоксидантного ферменту СОД відмічено не було. Зокрема, позакоренева обробка сіркою та фосфором (100 мкМ KH_2PO_4) впливає на зростання активності глутатіонредуктази та вмісту SH-груп у рослинах пшениці, що може сприяти підвищенню стійкості рослин до стресових факторів за рахунок зростання пулу сірковмісних сполук.

Список літератури

1. Душкин А. Н. Комплексное действие удобрений, микроэлементов и регуляторов роста / А. Н. Душкин, Н. С. Беспалова // Химизация сельского хозяйства. – 1990. – № 6. – С. 59–61.
2. Моргун В. В. Физиологические основы формирования высокой продуктивности зерновых злаков / В. В. Моргун, В. В. Швартай, Д. А. Киризий // Физиология и биохимия культурных растений. – 2010. – Т. 42, № 5. – С. 371–393.
3. Швартай В. В. Особенности реакции растений на дефицит фосфора / В. В. Швартай, Б. И. Гуляев, А. Б. Карлова // Физиология и биохимия культурных растений. – 2009. – Т. 41, № 3. – С. 208–220.
4. Saito K. Sulfur assimilatory metabolism. The long and smelling road / K. Saito // Plant Physiol. – 2004. – Vol. 136, № 1. – P. 2443–2450.
5. Минеев В. Г. Агрохимия: учебник. 3-е издание / В. Г. Минеев. – М. : Наука, 2006. – 720 с.
6. Rengel Z. Sulfhydryl groups in root-cell plasma membranes of wheat genotypes differing in Zn efficiency / Z. Rengel // Physiologia Plantarum. – 1995. – Vol. 4. – P. 604–612.
7. Pinto R. E. The nature of the sex-linked differences in glutathione peroxidase activity and aerobic oxidation of glutathione in male and female rat liver / R.E. Pinto, W. Bartley // J. Biochem. – 1969. – Vol. 115, № 3. – P. 449–456.
8. Кругликов Г.О. Глутатионпероксидазная и глутатионредуктазная активность печени крыс после введения селенита натрия / Г.О. Кругликов, И.М. Штутман // Український біохіміческий журнал. – 1976. – № 2. – С. 223–227.
9. Sedlak J. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent / J. Sedlak, R. H. Lindsey // Anal. Biochem. – 1968. – Vol. 24; 25, № 1. – P. 192–205.
10. Glutathione reductase activity and isoforms in leaves and roots of wheat plants subjected to cadmium stress / G.G. Yannarelli, A.J. Fernandez-Alvare, D.M. Santa-Cruz [et al.] // Phytochemistry. – 2007. – Vol. 68. – P. 505–512.
11. Response of ultraviolet-B and nickel on pigments, metabolite and antioxidants of *Pisum sativum* L. / S. Suruchi, M. Shweta, K. Rima [et al.] // J. Env. Biol. – 2009. – Vol. 30, № 5. – P. 677–684.

12. Bielawski W. Reduced and oxidized glutathione reductase activity in tissues of *Pisum sativum* / W. Bielawski, K. W. Joy // *Planta*. – 1986. – Vol. 169. – P. 267–272.
13. Ascorbic acid metabolism in the ascorbate deficient *Arabidopsis* mutant vtc1 / P. L. Conklin, J. E. Pallanca, R. L. Last [et al.] // *Plant Physiol.* – 1997. – Vol. 115. – P. 1277–1285.
14. Sies H. Biochemistry of thiol groups: the role of glutathione / H. Sies // *Naturwissenschaften*. – 1989. – Vol. 76, № 2. – P. 57–64.
15. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signaling / G. Noctor, L. Gomez, H. Vanacker [et al.] // *J. Exp. Bot.* – 2002. – Vol. 53. – P. 1283–1304.
16. The role of oxygen species in plant signal transduction / F. Van Breusegem, E. Vranova, J. Dat [et al.] // *Plant Sci.* – 2001. – Vol. 161. – P. 405–414.
17. Turhan E. The activity of antioxidative enzymes in three strawberry cultivars related to salt-stress tolerance / E. Turhan, H. Gulen, A. Eris // *Acta Physiol. Plant.* – 2008. – Vol. 30. – P. 201–208.
18. Expression of ascorbate peroxidase and glutathione reductase in roots of rice seedlings in response to NaCl and H₂O₂ / Y.C. Tsai, C.Y. Hong, L.F. Liu, C.H. Kao // *J. Plant Physiol.* – 2005. – Vol. 162. – P. 291–299.
19. Dixit V. Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L.) / V. Dixit, V. Pandey, R. Shyam // *J. Exp. Bot.* – 2001. – Vol. 52. – P. 1101–1109.
20. Бараненко В.В. Супероксиддисмутаза в клетках растений / В.В. Бараненко // *Цитология*. – 2006. – Т. 48, № 6. – С. 465–474.
21. Гусейнова И.М. Антиоксидантная система у инфицированных нановирусами бобовых растений / И.М. Гусейнова, А.Ч. Мамедов, Н.Ф. Султанова // Электронный научный журнал «Современные проблемы науки и образования». – 2011. – № 6.
22. Fu J. Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress / J. Fu, B. Huang // *Environ. Exp. Bot.* – 2001. – Vol. 45. – P. 105–114.
23. Hernandez J.A. Short-term effects of salt stress on antioxidant systems and leaf water relations of pea plants / J.A. Hernandez, M.S. Almansa // *Physiol. Plant.* – 2002. – Vol. 115, № 2. – P. 251–257.
24. Прооксидантно-антиоксидантный статус хлоропластов гороха при действии стрессирующих абиотических факторов среды. 2. Антиоксидантная система защиты / Л.Н. Курганова, И.В. Баллаева, А.П. Веселов [та ін.] // *Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского*. – 2010. – № 2 (2). – С. 550–556.

Сандецкая Н.В. Влияние условий минерального питания на элементы антиоксидантного статуса растений озимой пшеницы / Н.В. Сандецкая, О.П. Каменчук, О.В. Ситар // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2012. – Т. 25 (64), № 3. – С.179-186.

Исследована активность глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы, супероксиддисмутазы, содержание малонового диальдегида и SH-групп в органах проростков пшеницы при действии внекорневой обработки различными концентрациями сульфата и ортофосфата. Выявлены изменения в антиоксидантном статусе растений при внекорневой обработке минеральными удобрениями (серой и фосфором).

Ключевые слова: озимая пшеница (*Triticum aestivum* L.), внекорневая подкормка, SH-группы, глутатионредуктазы, глутатионпероксидаза, малоновый диальдегид, супероксиддисмутаза.

Sandetska N.V. The effect of mineral nutrition conditions on antioxidant status of winter wheat plants parameters / N.V. Sandetska, O.P. Kamenchuk, O.V. Sytar // Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No. 3. – P. 179-186.

The activity of glutathione reductase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase and malondialdehyde content and SH-groups in leaves and roots of wheat seedlings under the actions of foliar treatment by various concentrations of sulfur and phosphorus has been studied. Stated changes in antioxidant status of wheat plants under foliar treatment by various concentrations of sulfur and phosphorus was discussed.

Keywords: winter wheat (*Triticum aestivum* L.), foliar treatment, sulfhydryl groups, glutathione reductase, free thiols, malondialdehyde, superoxide dismutase.

Поступила в редакцию 11.10.2012 г.

УДК 576.315.4

**ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ И МАГНИТНОЙ СОСТАВЛЯЮЩЕЙ
ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ПОЛЯ НА ПРОНИЦАЕМОСТЬ МЕМБРАН И
СОСТОЯНИЕ ХРОМАТИНА В ЯДРАХ КЛЕТОК БУККАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ
ЧЕЛОВЕКА**

Скамрова Г.Б.¹, Евстигнеев М.П.¹, Трушкин А.Н.¹, Шкорбатов Ю.Г.²

¹*Севастопольский национальный технический университет, Севастополь, Украина*

²*Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, Харьков, Украина*

E-mail: galina_skamrova@mail.ru

Исследовано влияние низкоинтенсивного электромагнитного излучения с частотой 8 ГГц, а также влияние электрической и магнитной составляющей излучения по отдельности, на проницаемость мембран и состояние хроматина в ядрах клеток буккального эпителия человека. Наблюдался статистически значимый отклик клетки на данное излучение, проявляющийся в увеличении количества гранул гетерохроматина и проницаемости мембран относительно контроля. Электрическая составляющая электромагнитного излучения оказывала наибольшее влияние на процесс образования гетерохроматина.

Ключевые слова: микроволновое излучение, гетерохроматин, проницаемость мембраны, буккальный эпителий.

ВВЕДЕНИЕ

Существует много свидетельств об отрицательном воздействии электромагнитного излучения (ЭМИ) сантиметрового и миллиметрового диапазона на живые организмы, к примеру [1-4]. Так как в настоящее время в связи с научно-техническим прогрессом использование микроволнового излучения резко возросло, исследование влияния электромагнитных полей низкой интенсивности на живые организмы является важным направлением современной биологии. Особое внимание уделяется изучению влияния ЭМИ на клеточном и молекулярном уровне.

Ранее [5] были инициированы исследования, целью которых стал поиск взаимосвязи между различными параметрами ЭМИ сантиметрового и миллиметрового диапазона и реакцией организма на клеточном уровне. В качестве объекта исследований использовались клетки буккального эпителия человека. В частности, было показано, что микроволновое излучение низкой интенсивности вызывает возрастание количества гранул гетерохроматина (КГГ) и приводит к конденсации хроматина в ядрах клеток буккального эпителия. Также параметр КГГ был чувствителен к действию других факторов, таких как биологически активные вещества, ультрафиолетовое и лазерное излучение [5-8]. Явление конденсации хроматина под действие ЭМИ было обнаружено и в лимфоцитах человека [9,10] при

параметрах поля, близких к излучению мобильных телефонов. Эти результаты позволяют предположить, что состояние хроматина может служить индикатором чувствительности клеток к действию ЭМИ, поскольку известно, что конденсация хроматина связана со снижением его транскрипционной активности. Если грануляция хроматина отражает реакцию клетки на ЭМИ и связана с изменением функциональной активности хроматина, можно ожидать, что отклик на ЭМИ может также наблюдаться и в других клеточных компонентах. Известно, что важную роль в рецепции микроволнового излучения играют клеточные мембранны, состояние которых связано с состоянием самой клетки [11,12].

Для выявления механизма действия микроволнового излучения на клетки человека необходимо определить, как изменяется отклик клетки при изменении параметров ЭМИ, таких как мощность и время экспозиции, частота, поляризация и т.п. Ранее было рассмотрено влияние лево-, право- и линейно поляризованного микроволнового излучения на хроматин в ядрах человеческих клеток [5]. Также в наших предыдущих работах [13,14] был установлен характер изменения КГГ и проницаемости мембран при различных мощностях и временах излучения. Во всех процитированных исследованиях использовалось «стандартное» ЭМИ, содержащее суперпозицию колебаний электрической и магнитной составляющих. В связи с этим представляет интерес рассмотрение влияния электрического и магнитного полей по-отдельности на клеточном уровне, с целью ответа на вопрос о существовании какого-либо различия в эффекте действия каждого из них на живой организм.

В настоящей работе изучена реакция клеток букального эпителия на уровне мембранны и ядра на ЭМИ с частотой 8 ГГц низкой интенсивности, а также выявлены закономерности отклика клетки на электрическую и магнитную составляющие поля по-отдельности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования

Эксперименты проводились на клеточной культуре букального эпителия человека. Процесс изъятия клеток с внутренней поверхности щеки является абсолютно безболезненным и бескровным, и все доноры были проинформированы о целях эксперимента. Отбор клеток производился у трех доноров мужского пола: донор А – 21 год, В – 21 год, С – 24 года, и двух женского пола: донор Д – 23 года, Е – 21 год. Все доноры были не курящие.

Клетки помещались в 3,03 мМ фосфатный буфер (рН 7,0) с добавлением 2,89 мМ хлорида кальция [7,15]. Затем суспензия распределялась по полипропиленовым пробиркам «Эплендорф» (0,2 мл каждый) и помещалась в водяную баню при температуре 36 ± 1 °С. Продолжительность экспериментов составляла 2-4 часа, и за это время не наблюдалось видимых изменений в структуре ядра и мембранны клеток.

Процедура облучения

Пробирка, содержащая исследуемый образец, помещалась в волноводный тракт, в котором была сформирована стоячая волна с частотой 8 ГГц и плотностью потока мощности ~ 60 мВт/см². Принципиальная схема установки представлена на рис. 1.

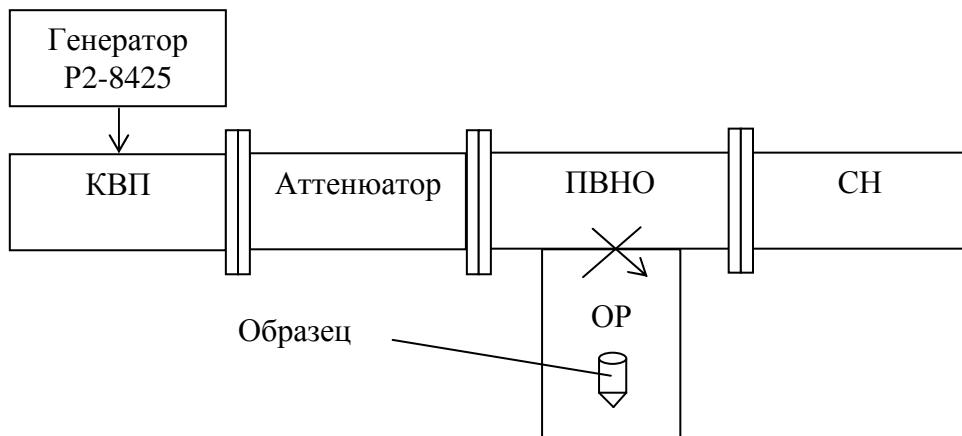


Рис. 1. Принципиальная схема установки

Примечание: Р2-8425 — генератор к панорамному измерителю коэффициента стоячей волны и ослаблений; КВП — коаксиально-волноводный переход; ПВНО — первичный волновод направленного ответвителя; ОР — объемный резонатор на основе вторичного волновода направленного ответвителя; СН — согласованная нагрузка.

Установка работает следующим образом. С помощью генератора в волноводном тракте формируется волна с частотой 8 ГГц. Первая часть падающей от генератора волны поглощается согласованной нагрузкой (СН) первичного волновода. Вторая часть этой волны ответвляется из первичного волновода во вторичный, который работает в режиме объемного резонатора (ОР). Коаксиально-волноводный переход (КВП) обеспечивает связь между коаксиальным выходом генератора и направленным ответителем. ОР представляет собой отрезок вторичного волновода направленного ответвителя с двумя короткозамыкателями. Один из них подвижный и обеспечивает настройку резонатора на максимум электрического или магнитного поля в области пробы.

Образец располагался в рассчитанных в соответствии с частотой и характеристиками волновода максимумах электрической и магнитной составляющей излучения, а также в положении, равноудаленном от данных максимумов. Это позволило сравнить реакцию клеток на электрический и магнитный компонент по-отдельности не только с контрольным значением, но также и с реакцией на их совместное действие. Продолжительность облучения составляла 5 минут.

Метод оценки показателя КГГ

Функциональное состояние клеточных ядер напрямую зависит от структурных переходов из гетерохроматина в эухроматин. Возрастание параметра КГГ указывает на уменьшение транскрипционной активности в ядрах. Оценка параметра

КГГ проводилась с помощью метода, предложенного в [5]. Облученные клетки и контрольный образец были окрашены 2% раствором орсеина в 45% уксусной кислоте [16]. Ядра клеток были визуально изучены под микроскопом MICRomed XS-3330 с увеличением 1000. В каждом образце параметр КГГ был определен для 30 случайных клеток. Ранее [5] было показано, что данное количество является оптимальным, т.е. дальнейшее увеличение количества проанализированных ядер не приведет к значительному уменьшению стандартной ошибки, но значительно замедляет процесс анализа.

Метод оценки проницаемости клеточных мембран

Состояние клеточных мембран было оценено по процентному содержанию клеток, окрашенных 5 mM раствором индигокармина *in vitro* в течение 1 мин [12]. При определении показателя окрашенности клеток индигокармином (ОКИ, %) в каждом образце учитывалось 300 клеток (3 повтора по 100 клеток), а затем была рассчитана средняя величина показателя ОКИ. Подсчет клеток производился визуально с помощью микроскопа MICRomed XC-3330 с увеличением 400.

Статистическая обработка данных

Расчеты средних значений и стандартных ошибок среднего производились в программе Microsoft Office Excel. Достоверность различий между средними значениями показателей после облучения и контрольного, необлученного образца оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Для оценки статистической связи между полученными данными и влиянием различных факторов в программе SigmaStat был выполнен дисперсионный анализ ANOVA. В работе был принят уровень достоверности $P<0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние электрической и магнитной составляющей излучения на проницаемость мембран клеток буккального эпителия человека

Данные первого этапа эксперимента по влиянию электрической и магнитной составляющих ЭМИ на показатель ОКИ для всех доноров представлены на рис. 2., где указаны средние данные \pm значения стандартной ошибки среднего.

Как видно из приведенных выше гистограмм, для всех доноров наблюдается статистически значимое увеличение проницаемости мембран при действии электрического компонента излучения. Реакция мембран клеток для магнитного и смешанного компонента носят индивидуальный характер для каждого донора. В целом, зависимость показателя ОКИ от различных составляющих излучения не демонстрирует четкой тенденции, достоверное превышение эффекта электрической составляющей ЭМП над магнитной отмечено только для клеток одного донора (донор Д).

Результаты двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA приведены в таблице 1.

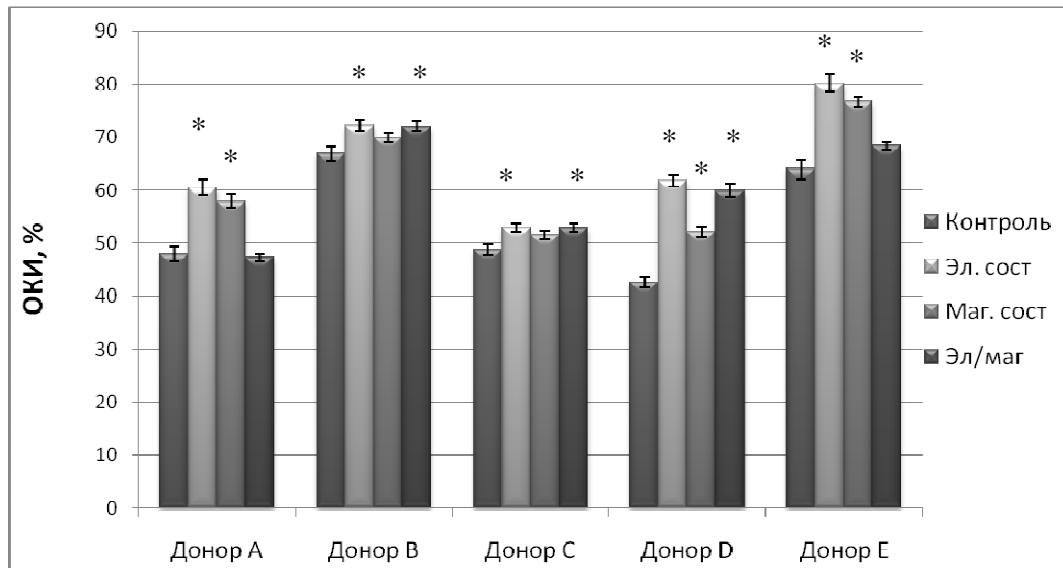


Рис. 2. Влияние электрической и магнитной составляющей излучения на окрашенность клеток индигокармином (ОКИ) для доноров А – Е.

Примечание: * - статистически значимое отклонение от контрольного значения.

Таблица 1
Результаты двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA для данных первого этапа эксперимента

Фактор	Количество степеней свободы	Общая сумма квадратов	Средний квадрат	Критерий Фишера	Уровень значимости
Донор	4	1667,4	416,8	5,3	0,02
Компонент	2	281,2	140,6	1,8	0,23

Как видно из таблицы 1, критерий Фишера максимален для фактора «донор», что соответствует наличию индивидуальных закономерностей в отклике клетки на ЭМИ среди пяти доноров в соответствии с рис. 2. Уровень значимости для фактора «компонент» превышает допустимый, следовательно, различие в действии электрической и магнитной составляющих ЭМП на проницаемость мембран клетки не является статистически значимым.

Влияние электрической и магнитной составляющей излучения на состояния хроматина в ядрах клеток буккального эпителия человека

Результаты по влиянию электрической и магнитной составляющих ЭМИ на показатель КГГ для всех доноров представлены на рис. 3, где указаны средние данные \pm значения стандартной ошибки средних.

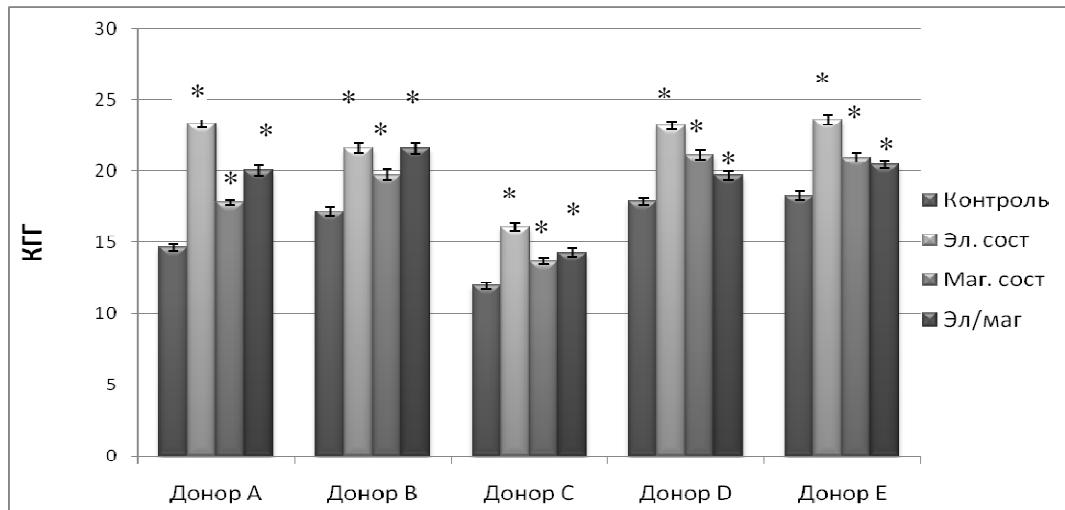


Рис. 3. Влияние электрической и магнитной составляющей излучения на показатель ККГ для пяти доноров.

Примечание: * - статистически значимое отклонение от контрольного значения.

Ключевым результатом данного эксперимента является то, что при данной частоте и длительности экспозиции для всех доноров во всех рассмотренных случаях наблюдается статистически значимое увеличение показателя ККГ относительно контрольного значения. Это согласуется с данными, полученными ранее [8, 9] и ещё раз доказывает, что конденсация хроматина (изменение показателя ККГ) может быть рассмотрена как маркер отклика клетки на ЭМИ.

Однако наиболее важным результатом в контексте настоящей работы является то, что для каждого донора электрическая составляющая ЭМИ оказывает большее влияние на увеличение показателя ККГ, чем магнитная и электромагнитное поле, согласно t-тесту Стьюдента. Результаты t-теста представлены в таблице 2. Разница между показателями ККГ для пар «электрическая – магнитная» и «электрическая – электромагнитная» для всех доноров является статистически значимой. Статистических различий между воздействием магнитной компоненты и воздействием электромагнитного поля согласно t-тесту не наблюдалось.

Таблица 2
Результаты t-теста по сравнению показателей ККГ для электрической и магнитной составляющих ЭМИ

Донор	Количество исслед. ядер	Среднее значение	Среднекв. отклонение	Стандартная ошибка среднего	t-критерий	Уровень значимости
А	30	23,4	1,8	0,33	71,5	<0,001
В	30	21,6	1,7	0,32	67,8	<0,001
С	30	16,1	1,4	0,25	65,2	<0,001
Д	30	23,2	1,4	0,26	88,2	<0,001
Е	30	23,6	1,8	0,32	73,0	<0,001

Результаты двухфакторного анализа ANOVA представлены в таблице 3.

Таблица 3

Результаты двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA для данных второго этапа эксперимента

Фактор	Количество степеней свободы	Общая сумма квадратов	Средний квадрат	Критерий Фишера	Уровень значимости
Донор	4	860,7	215,2	4,4	0,04
Компонент	2	998,9	499,5	10,1	0,01

Согласно полученным результатам, критерий Фишера максимален для фактора «компонент». Уровень значимости в обоих случаях меньше установленного (0,05), следовательно, значения критерия Фишера для каждого фактора является статистически значимой величиной. Таким образом, из таблицы 3 следует, что компоненты ЭМИ оказывают значительное влияние на изменение показателя КГГ, в то время как фактор «Донор» влияет слабее.

Как следует из полученных выше результатов, ЭМИ с частотой 8 ГГц и плотностью потока мощности порядка 60 мВт/см² оказывает большее влияние на ядро клетки (повышение гетерохроматинизации), чем на нарушение целостности мембран (рост показателя ОКИ). Таким образом, наиболее значимый эффект, наблюдаемый нами в эксперименте, заключается в конденсации хроматина. Известно о наличии электростатического взаимодействия между отрицательно заряженной ДНК и положительно заряженными белками-гистонами в нуклеосоме [17], а также что данное взаимодействие во многом обуславливает состояние хроматина [18-21]. Существует несколько представлений о механизмах влияния ЭМИ на живые организмы, основным из которых является поляризация связанных зарядов, ориентация постоянных диполей и перемещение свободных ионов [22, 23]. Важную роль в этом механизме играет электрическое поле. На уровне нуклеосомы влияние электрической компоненты ЭМИ должно проявляться следующим образом: под действием облучения происходит перераспределение заряда компонентов нуклеосомы, что в свою очередь приведет к ослаблению или усилению связи гистон-ДНК, то есть к деконденсации или конденсации хроматина, соответственно. Полученные нами результаты косвенно согласуются с этими представлениями, а именно, на уровне хроматина нами наблюдался больший эффект действия электрической составляющей ЭМИ, чем магнитной. Отметим, однако, что это не исключает роли магнитного поля в отклике клеток. Известно [22, 23], что магнитные поля индуцируют электрические токи в организме, зависящие от условий облучения и расположения объекта в поле, которые в свою очередь действуют по описанной выше схеме. Данная модель соответствует полученным в работе результатам: и при действии как электрической, так и магнитной составляющей ЭМИ наблюдается увеличение показателя КГГ, однако действие электрического поля на хроматин выражено сильнее, чем действие магнитного.

ВЫВОД

Результаты, полученные в данной работе, указывают на существование статистически значимого отклика клеток bukkального эпителия человека на электромагнитное излучение на частоте 8 ГГц и плотности потока мощности 60 мВт/см², проявляющегося в изменении количества гранул гетерохроматина и проницаемости мембран относительно контрольного значения.

Показано, что электрическая составляющая электромагнитного поля оказывает незначительно преобладающее влияние на увеличение гетерохроматинизации в сравнении с магнитной для всех доноров. Для показателя окрашенности клеток индигокармином при тех же условиях облучения подобной закономерности не наблюдалось. Полученные результаты указывают на возможный механизм взаимодействия электромагнитного излучения сантиметрового диапазона с клеточным хроматином, в основе которого лежит изменение степени взаимодействия ДНК-гистон.

Список литературы

1. Repacholi M.H. Radiofrequency field exposure and cancer: What do the laboratory studies suggest? / M.H. Repacholi // Env. Health Res. Persp. – 1997. – Vol.105, Suppl. 6. – P. 1565-1568.
2. Szmidielski S. Cancer morbidity in subjects occupationally exposed to high frequency (radio-frequency and microwave) electromagnetic radiation / S. Szmidielski // Sci. Total Environ. – 1996. – Vol.160. – P. 9-17.
3. Kerbacher J.J. Influence of Radiofrequency Radiation on Chromosome Aberrations in CHO Cells and Its Interaction with DNA-Damaging Agents / J.J. Kerbacher, M.L. Meltz, D.N. Erwin // Radiation Research. – 1990. – Vol. 123, No. 3. – P. 311-319.
4. Изменение свойств клеточных мембран, хроматина и электрокинетических свойств ядер клеток человека при действии низкоэнергетического микроволнового облучения / Ю.Г. Шкорбатов, В.Г. Шахбазов, В.В. Навроцкая [и др.] // Матер. 11 Международ. Крымской конф. CriMiCo. – 2001. – С. 92-950.
5. The influence of differently polarized microwave radiation on chromatin in human cells / Y.G. Shckorbatov, V.N. Pasiuga, N.N. Kolchigin [et al.] // Int. J. Radiat. Biol. – 2009. – Vol. 85, No.4. – P. 322–329.
6. Shckorbatov Y. Age-related changes in the state of chromatin in human buccal epithelium cells / Y. Shckorbatov // Gerontology. – 2001. – Vol.47. – P. 224–225.
7. Microwave irradiation influences on the state of human cell nuclei / Y.G. Shckorbatov, V.G. Shakhbazov, N.N. Grigoryeva [et al.] // Bioelectromagnetics. – 1998. – Vol. 19. – P. 414–419.
8. Changes in the state of chromatin in human cells under the influence of microwave radiation / Y.G. Shckorbatov, V.G. Shakhbazov, V.V. Navrotska [et al.] // 16th International Wroclaw Symposium and Exhibition on electromagnetic compatibility, Wroclaw Part. – 2002. – Vol. 1. – P. 87–88.
9. Microwaves from GSM mobile telephones affect 53BP1 and g-H2AX foci in human lymphocytes from hypersensitive and healthy persons / E. Markova, L. Hillert, L. Malmgren [et al.] // Environmental Health Perspectives. – 2005. – Vol. 113. – P. 1172–1177.
10. Sarimov R. Nonthermal GSM microwaves affect chromatin conformation in human lymphocytes similar to heat shock / R. Sarimov, L.O. Malmgren, E. Markova // Plasma Science, IEEE Transactions. – 2004. – Vol. 32. – P. 1600–1608.
11. The process of recovery of cell membrane damage produced by the low-level microwave radiation / V.N. Pasiuga, Yu.G. Shckorbatov, N.N. Kolchigin [et al.] // International Conference on Antenna Theory and Techniques (ICATT) – 2009. – P. 360-362.
12. On age-related changes of cell membrane permeability in human buccal epithelium cells / Yu.G. Shckorbatov, V.G. Shakhbazov, A.M. Bogoslavsky [et al.] // Mech. Ageing and Develop. – 1995. – Vol. 83, No 1.– P.87-90.

13. Влияние микроволнового излучения на частотах мобильной связи и сети WiMAX на состояние хроматина клеток bukkального эпителия человека / О.В. Бойко, А.О. Лантушенко, Г.А. Лукьянчук [и др.] // Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2010. – Том 23 (62), № 4. – С. 56-65.
14. Влияние микроволнового излучения на частотах мобильной связи и сети WiMAX на проницаемость мембран клеток bukkального эпителия человека / Скамрова Г.Б., Евстигнеев М.П., Лантушенко А.О. [и др.] // Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2011. – Том 24 (63), № 4. – С. 282-291.
15. Тартаковский А.Д. Питательные среды для культивирования клеток млекопитающих. Методы культивирования клеток / Тартаковский А.Д. – Л.: Наука, 1988. – С.44-63.
16. Shckorbatov Y. He-Ne laser light induced changes in the state of the chromatin in human cells / Y. Shckorbatov // Naturwissenschaften. – 1999. – Vol. 86. – P. 450-453.
17. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution / K. Luger, A.W. Mader, R.K. Richmond [et al.] // Nature. – 1997. – Vol. 389. – P. 251-260.
18. Roth S.Y. Chromatin condensation: does histone H1 dephosphorylation play a role? / S.Y. Roth, C.D. Allis // Trends in biochem.sciences. – 1992. – Vol.17. – P. 93-98.
19. Hilder V.A. Studies on the Template Activity of 'Isolated' Xenopus Erythrocyte Nuclei / V.A. Hilder, N. Maclean // J Cell Sci – 1974. – Vol.16. – P. 133-142.
20. Korolev N. Physicochemical analysis of electrostatic foundation for DNA–proteininteractions in chromatin transformations / N. Korolev, O.V. Vorontsova, L. Nordenskiold // Progr. in biophysics and mol. biology. – 2007. – Vol. 95. – P. 23-49.
21. Korolev N. Modelling chromatin structure and dynamics: Status and prospects / N. Korolev, Y. Fan, A.P. Lyubartsev [et al.] // Current Opinion in Structural Biology. – 2012. – Vol. 22(2). – P. 151-159.
22. McKinlay A. ICNIRP - basis for EMF exposure guidelines / A. McKinlay, J. Bernhardt // 3rd International EMF Seminar in China: Electromagnetic Fields and Biological Effects. – 2003. – P. 63-67.
23. Bernhardt J.H. Non-ionizing radiation safety: radiofrequency radiation, electric and magnetic fields / J.H. Bernhardt // Phys. Med. Biol. – 1992. – Vol. 37(4). – P. 807-844.

Скамрова Г.Б. Вплив електричного і магнітної складової електромагнітного поля на проникність мембрани і стан хроматину в ядрах клітин bukkального епітелію людини / Г.Б. Скамрова, М.П. Євстигнєєв, А.М. Трушкін, Ю.Г. Шкорбатов // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2012. – Т. 25 (64), № 3. – С. 187-195.

Досліджено вплив низькоінтенсивного електромагнітного випромінювання з частотою 8 ГГц, а також вплив електричної та магнітної складової випромінювання окремо на проникність мембрани і стан хроматину в ядрах клітин bukkального епітелію людини. Спостерігався статистично значимий відгук клітини на дане випромінювання що проявляється в збільшенні кількості гранул гетерохроматину і проникності мембрани відносно контролю. Електрична складова електромагнітного випромінювання здійснювала найбільший вплив на процес утворення гетерохроматину.

Ключові слова: мікрохвильове випромінювання, гетерохроматин, проникність мембрани, bukkальний епітелій.

Skamrova G.B. The effect of mobile phone and WiMAX network microwave radiation on membrane permeability of human buccal epithelium cells / G.B. Skamrova, M.P. Evstigneev, A.N. Trushkin, Y.G. Shckorbatov // Scientific Notes OF Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No 3. – P. 187-195.

The effect of low-intensity electromagnetic radiation at 8 GHz frequency, and the influence of electrical and magnetic radiation components separately on membrane permeability and chromatin state in the nuclei of human buccal epithelium cells was investigated. The statistically meaningful cells response to this radiation manifested by increase in the number of heterochromatin granules and membrane permeability with respect to control mean was observed. The electrical component of electromagnetic radiation has the greatest influence on the heterochromatin formation.

Keywords: microwave radiation, heterochromatin, membrane permeability, buccal epithelium.

Поступила в редакцию 11.09.2012 г.

Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского
Серия «Биология, химия». Том 25 (64). 2012. № 3. С. 196-205.

УДК 616.441- 008.61 + 612.745.1

**ХАРАКТЕР ЗАВИСИМОСТИ ТЕПЛОВОЙ СТОИМОСТИ МЫШЕЧНОГО
СОКРАЩЕНИЯ ОТ УРОВНЯ ЦИРКУЛИРУЮЩЕГО СВОБОДНОГО
ТРИЙОДТИРОНИНА У БЕЛЫХ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ
ТИРЕОТОКСИКОЗЕ**

Станишевская Т.И.

*Мелитопольский государственный педагогический университет, Мелитополь, Украина
E-mail: v.sobolev@mail.ru*

В экспериментах *in situ* показано, что в условиях эутиреоидного статуса существует выраженная ($R = 0,82$) положительная связь между уровнем циркулирующего свободного трийодтиронина и величиной тепловой стоимости мышечного сокращения; при экспериментальном трийодтирониновом тиреотоксикозе направленность связи ($R = 0,88$) инвертируется, приобретая отрицательный характер. Установлено, что на верхней границе нормы физиологических колебаний уровня трийодтиронина «5,0 ч 7,1 пмоль/л» тепловая стоимость единицы работы мышцы (мДж) на 37% выше, чем в начале шкалы концентраций гормона «2,2 ч 4,8 пмоль/л», а при экспериментальном тиреотоксикозе, наоборот – в конечной области концентраций трийодтиронина («11,9 ч 13,8 пмоль/л») тепловая стоимость мышечного сокращения на 19% ниже, чем в начальном диапазоне «8,8 ч 11,8 пмоль/л». Показано, что точность процесса регуляции трийодтиронином тепловой стоимости мышечного сокращения при состоянии эутиреоза и экспериментальном тиреотоксикозе, по данным показателей вариабельности, ухудшается вместе с ростом уровня циркулирующего трийодтиронина (соответственно в 2,9 и 2,2 раза).

Ключевые слова: тиреотоксикоз, трийодтиронин, скелетная мышца, энергетика.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из фундаментальных механизмов действия гормонов щитовидной железы является способность тиреоидных гормонов к регуляции различных сторон функционирования нервно-мышечной системы [1–3]. В настоящее время имеются экспериментальные доказательства участия активных йодтиронинов в модуляции работы ионных насосов мышечного волокна [4, 5], процессах нервно-мышечной передачи [6–8], а также регуляции работоспособности скелетной мышцы [3, 9, 10]. Однако многие аспекты проблемы тиреоидного контроля мышечного сокращения остаются недостаточно исследованными. В частности, представляется важным вопрос о характере регуляции тиреоидными гормонами одного из важных механизмов эрготропной функции скелетной мышцы – термогенной. Несмотря на ряд исследований, выполненных в этом направлении [11–13], остался вне поля зрения такой аспект проблемы, как характер регуляции тепловой эффективности сократительного акта при состоянии выраженного тиреотоксикоза.

Целью работы явилось установление характера связи между уровнем циркулирующего свободного трийодтиронина при различном тиреоидном статусе (эутиреозе и тиреотоксикозе), с одной стороны, и тепловой стоимостью единицы внешней работы (мДж), выполненной скелетной мышцей белых крыс в условиях *in situ*, с другой.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены на 80 взрослых белых крысах-самцах массой $288 \pm 1,3$ г. Все животные были разделены на две группы. Первой группе крыс (30 животных) ежедневно в течение 4 дня подкожно вводился трийодтиронин в дозе 25 мкг/кг (тиреотоксикоз, 25T₃-группа). Для опыта животные использовались на следующий день после окончания инъекций гормона (5-е сутки). Вторая группа крыс (50) была контрольной.

Первоначально у ненаркотизированных животных в условиях термонейтральной зоны при температуре 28-30 °С измерялись ректальная температура (электронный термометр) и величина потребления кислорода (электронный газоанализатор «Radiometer»). Результаты показали, что средняя величина потребления кислорода у контрольной группы животных составила $23,7 \pm 0,23$ мл/кг мин, а значение ректальной температуры соответственно $37,8 \pm 0,1$ °С. У крыс опытной 25T₃-группы потребление кислорода было на $10,7 \pm 0,77$ мл/кг мин больше (48%, $p < 0,01$), а ректальная температура повысилась до $39,4 \pm 0,2$ °С, превышая контрольный уровень на $2,1 \pm 0,3$ °С ($p < 0,01$).

Для измерения температурного коэффициента мышечного сокращения использовалась экспериментальная установка, представленная термометрическим и эргометрическим измерительными каналами. Термометрический канал включает датчик температуры (медь-константановая термопара), фотоусилитель Ф-116, оптронный преобразователь и многоканальный цифровой запоминающий осциллограф Tektronix (TDS2004C). Термопара выполнялась из проводов диаметром 50 мкМ и в ходе проведения опыта прошивалась через исследуемую переднюю большеберцовую мышцу. Эргометрический канал включает mechanодатчик (потенциометрический датчик ПТП-1), усилитель постоянного тока и цифровой запоминающий осциллограф TDS2004C.

Для раздражения нерва использовался электростимулятор, построенный на основе функционального генератора ICL8038CCDP, оптронная гальваническая связь на основе оптрана 6N135 (TOSHIBA) и биполярные игольчатые стальные электроды.

Процедура измерения температурного эффекта изотонического мышечного сокращения была следующей. Животное наркотизировалось (тиопентал в дозе 75 мг/кг внутрибрюшинно), а затем фиксировалось в станке установки. Далее препарировался малоберцовый нерв, который в дальнейшем помещался в погружной электрод. Названный нерв иннервирует переднюю большеберцовую мышцу, сокращение которой вызывает сгибание стопы задней лапки. Стопа задней лапки животного крепилась зажимом, после чего на уровне большого пальца затягивалась лигатура, соединенная с потенциометрическим датчиком (датчик перемещения). При электрическом

раздражении малоберцового нерва стопа изгибалась, поднимая груз массой 100 граммов. Зная высоту, на которую поднимался груз, в дальнейшем можно было рассчитать выполненную внешнюю работу (A , мДж). Для раздражения нерва использовался следующий режим: 7 секунд прямоугольными электрическими импульсами длительностью 100 мкс каждый при частоте 60 имп/с и амплитуде 300 мВ.

Параллельно регистрировалась и термограмма (рис. 1), на основании которой измерялась величина прироста температуры мышцы при ее сокращении ($+ΔT^0$). Это позволяло в дальнейшем рассчитать отношение « $+ΔT^0$ » к « A ». Полученное отношение и являлся показателем «температурного коэффициента мышечного сокращения» - ТКМС, отражающим тепловую стоимость единицы (в данном случае 1 мДж) внешней работы, выполненной мышцей [9].

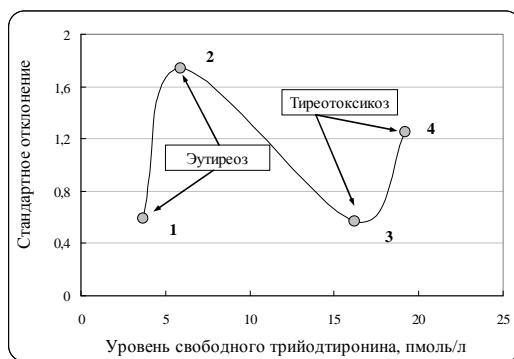


Рис. 3. Зависимость величины стандартного отклонения для средних значений ТКМС от уровня циркулирующего трийодтиронина у крыс с различным тиреоидным статусом
Примечание: 1, 2, 3, 4 – значение стандартного отклонения для каждого из четырех множеств в совокупных вариационных рядах значений температурного коэффициента мышечного сокращения (ТКМС) у эутиреоидных крыс и животных с экспериментальным тиреотоксикозом

и проведения кластерного анализа (метод k-средних). Оценка отличий между двумя множествами проводилась с помощью двухвыборочного F-теста для дисперсий. Сравнение показателей и статистическая оценка различий проводились общепринятыми методами, используемыми в параметрической статистике на основании проверки нулевой и альтернативной гипотез.

В ходе экспериментов строго придерживались Правил работы с экспериментальными животными. В частности, опыты проводились на наркотизированных животных, а после окончания эксперимента крысы

ХАРАКТЕР ЗАВИСИМОСТИ ТЕПЛОВОЙ СТОИМОСТИ МЫШЕЧНОГО...

умерщвлялись путем декапитации. Проведение экспериментов было согласовано с Комиссией по биоэтике при Донецком национальном университете.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты определения уровней свободного трийодтиронина в крови крыс обеих групп представлены в таблице. Видно, что у крыс опытной группы, которым предварительно вводился трийодтиронин, как и следовало ожидать, средняя величина уровня циркулирующего свободного трийодтиронина достигала значения $17,48 \pm 0,33$ пмоль/л, что было выше контрольного уровня на +291% ($p < 0,001$). Характер распределения исследованных совокупностей значений уровня трийодтиронина у взрослых белых крыс-самцов при эутиреоидном статусе и тиреотоксикозе использованной модели соответствует нормальному закону.

Таким образом, у животных опытной группы вызывалось состояние экспериментального тиреотоксикоза выраженной степени.

Таблица 1
Содержание циркулирующего свободного трийодтиронина у белых крыс в условиях эутиреоза и при экспериментальном тиреотоксикозе

Статистический показатель	Трийодтиронин свободный, пмоль/л	
	Эутиреоз (Контроль)	Тиреотоксикоз
Среднее	4,46	17,48 (+291%) $p < 0,001$
Стандартная ошибка	0,17	0,33
Стандартное отклонение	1,22	1,81
Дисперсия	1,48	3,28
Эксцесс	0,22	-1,01
Асимметричность	0,661	0,042
W тест Шапиро-Уилка	0,973 $p=0,307$	0,964 $p=0,399$
Коэффициент вариации	27%	10%
Число животных, n	50	30

Примечание: в круглых скобках приведена разница концентрации трийодтиронина по отношению к контрольной группе крыс

Регрессионный анализ характера связи «ТКМС – T_3 » в целостной совокупности показал, что у крыс контрольной группы он описывается уравнением параболы общего вида: $y = 0,17x^2 - 0,63x + 6,96$ при высоком значении величины достоверности аппроксимации кривой ($R^2=0,68$, или $R=0,82$ при $p=2,45E-06$), где « y » - концентрация трийодтиронина, пмоль/л; « x » - температурный коэффициент мышечного сокращения, ($^0\text{C}/\text{мДж}$) 10^{-3} . Значения всех коэффициентов в приведенном уравнении статистически достоверны ($p < 0,0308$ ч $2,0E-05$).

Аналогичная процедура была проведена и в отношении целостной совокупности значений исследуемых показателей у крыс с экспериментальным тиреотоксикозом. Характер выявленной связи «ТКМС – T_3 » также описывается уравнением параболы общего вида с параметрами: $y = 0,14x^2 + 4,1x - 10,9$ при высоком значении величины достоверности аппроксимации кривой ($R=0,88$ при $p=1,37E-07$), где « y » - концентрация трийодтиронина, пмоль/л; « x » - температурный коэффициент мышечного сокращения, ($^0\text{C}/\text{мДж}$) 10^{-3} . Значения всех коэффициентов в приведенном уравнении статистически достоверны ($p<0,048$ ч 0,017).

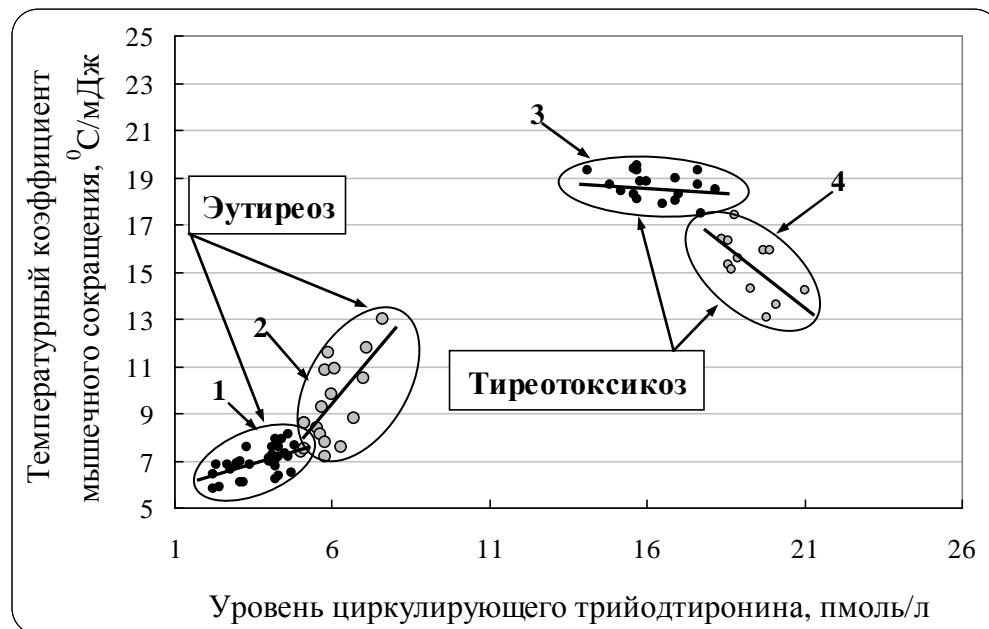


Рис. 2. Зависимость температурного коэффициента мышечного сокращения от уровня циркулирующего свободного трийодтиронина у крыс при различном тиреоидном статусе

Примечание: 1, 2, 3, 4 - отдельные множества из варианта целостного вариационного ряда, выделенные методом кластерного анализа

Визуальный анализ графика рассеивания значений ТКМС у животных обеих групп показал (рис. 2), что в исследуемых вариационных рядах могут существовать отдельные независимые множества. Для их выделения был применен кластерный анализ (табл. 2). Действительно, в каждом отдельном вариационном ряде (у контрольных и тиреотоксикозных животных) легко выделяются, как минимум, по два кластера (табл. 2), представленными независимыми множествами. На рис. 2 эти множества окантованы овалами. Кроме того, выделенные пары независимых множеств в целостной совокупности крыс контрольной группы (множества 1 и 2 на рис. 2) статистически различаются (двухвыборочный F-тест для дисперсии,

ХАРАКТЕР ЗАВИСИМОСТИ ТЕПЛОВОЙ СТОИМОСТИ МЫШЕЧНОГО...

$p=1,43E-07$). У животных тиреотоксикозной группы два множества (3 и 4 на рис. 2) также статистически различаются друг от друга ($p=0,0065$).

После выделения в целостных совокупностях «ТКМС – T_3 » у контрольных и тиреотоксикозных крыс по два независимых множества стало возможным провести оценку характера зависимости между исследуемыми показателями (ТКМС и T_3) внутри каждого из них.

Таблица 2

Характеристика зависимости между уровнем циркулирующего трийодтиронина и величиной температурного коэффициента сокращения у белых крыс при различном тиреоидном статусе

Показатель	Кластеры			
	Эутиреоз		Тиреотоксикоз	
	1 (n = 33)	2 (n = 17)	3 (n = 18)	4 (n = 12)
Уровень циркулирующего трийодтиронина, пмоль/л	3,8±0,15	6,1±0,18	16,2±0,25	19,3±0,34
Температурный коэффициент мышечного сокращения, ($^0\text{C}/\text{мДж}$) 10^{-3}	7,0±0,15	9,7±0,41	18,6±0,19	15,3±0,34

Примечание: при выделении классов использовался кластерный анализ (метод k-средних)

Регрессионный анализ показал, что у крыс контрольной группы характер связи «ТКМС – T_3 » в первом и втором множествах описывается однотипными уравнениями прямой линии с соответствующими параметрами (табл. 3).

Различия в величинах коэффициентов регрессии в обоих уравнениях достигали 370% и были статистически достоверными ($p<0,01$). На шкале концентрации T_3 (шкала «Х» на рис. 2) обозначенные множества занимают два разных участка. Первый участок располагается в области более низкой концентрации трийодтиронина «2,2 ч 5,0 пмоль/л», а второй - в диапазоне более высоких «5,1 ч 7,6 пмоль/л».

Физиологическое значение данного феномена заключается в том, что при эутиреоидном статусе, т.е. в условиях нормы, циркулирующий свободный трийодтиронин эндогенного происхождения выполняет роль модулятора теплообразовательной функции скелетной мышцы, в частности путем регуляции термогенной стоимости единицы выполняемой ею работы.

Целостная зависимость «ТКМС – T_3 » для крыс тиреотоксикозной группы также распадается на два множества, которые характеризуются разными коэффициентами регрессий и корреляции Пирсона ($p<0,05$). В начальной области концентраций трийодтиронина у крыс 25T3-группы (диапазон «14,1 ч 18,2 пмоль/л») зависимость отсутствовала, а в конечной области «18,4 ч 21,0 пмоль/л», была хорошо выражена.

В то же время средняя величина ТКМС в начальном диапазоне концентраций T_3 (3-й кластер) была на 19% выше ($p<0,01$), чем в конечном (4-й кластер, табл. 2). Следовательно, по достижении концентрации трийодтиронина определенного уровня тепловая стоимость мышечного сокращения более не растет, а, наоборот – начинает снижаться. Это, по-видимому, является следствием развития патофизиологического эффекта высокого уровня циркулирующего свободного трийодтиронина.

Таблица 3
Характеристика зависимости между величиной температурного коэффициента мышечного сокращения (y) и уровнем циркулирующего трийодтиронина (x) в разных диапазонах шкалы концентраций гормона

Группа	Диапазон концентрации трийодтиронина, пмоль/л	Уравнение регрессии	Коэффициент регрессии	Коэффициент корреляции Пирсона
Контроль n=50	2,2 - 4,9	$y=0,43 x + 5,4$	$0,43 \pm 0,11$ $p=4,3E-04$	$0,59 \pm 0,14$ $p<0,01$ $n=33$
	5,0 - 7,6	$y=1,61 x - 0,27$	$1,61 \pm 0,43$ $p=1,6E-03$	$0,68 \pm 0,18$ $p<0,01$ $n=17$
Тиреотоксикоз n=30	14,1 - 18,2	$y = -0,2 x + 22,1$	$-0,20 \pm 0,13$ $p=0,135$	$0,37 \pm 0,24$ $p<0,05$ $n=17$
	18,4 - 21,0	$y = -0,94x + 33,4$	$-0,91 \pm 0,04$ $p=0,042$	$0,59 \pm 0,28$ $p<0,05$ $n=13$

Представляет и интерес анализ точности регуляции величины ТКМС в разных секторах шкалы концентрации свободного трийодтиронина. Одним из ее показателей может служить, с нашей точки зрения, какой-либо общий параметр вариабельности регулируемого физиологического показателя (в нашем случае ТКМС), например величина дисперсии или связанного с ней среднего квадратического отклонения. Действительно, как видно на рис. 3, после достижения концентрации T_3 у крыс с эутиреоидным статусом уровня 5,0 ч 7,6 пмоль/л величина стандартного отклонения для среднего значения температурного коэффициента мышечного сокращения в указанном диапазоне резко возросла (в 2,9 раза), что может рассматриваться как признак снижения точности регуляции. Это же явление хорошо видно на рис. 2 (множество №2).

При экспериментальном тиреотоксикозе наблюдалась обратная закономерность. Так, если в начале диапазона концентрации T_3 (14,1 ч 18,2 пмоль/л, множество №3) величина стандартного отклонения была не высокой, то в диапазоне (18,4 ч 21,0 пмоль/л, множество №4), наоборот – резко (в 2,2 раза) увеличивалась.

Наблюдаемый эффект, по-видимому,

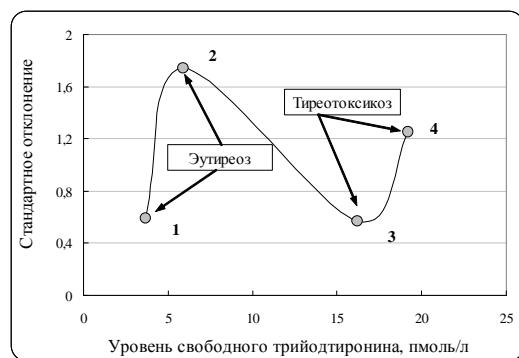


Рис. 3. Зависимость величины стандартного отклонения для средних значений ТКМС от уровня циркулирующего трийодтиронина у крыс с различным тиреоидным статусом

Примечание: 1, 2, 3, 4 – значение стандартного отклонения для каждого из четырех множеств в вариационных рядах значений температурного коэффициента мышечного сокращения (ТКМС) у эутиреоидных крыс и животных с экспериментальным тиреотоксикозом

стандартной единицы внешней работы (в нашем случае мДж) автоматически будет затрачивать большее количество энергии, что внешне выразится в повышении температурного коэффициента мышечной работы, что мы и наблюдали.

Таким образом, результаты экспериментов позволяют рассматривать эндогенный трийодтиронин как мощный активатор тепловой стоимости мышечного сокращения, функционирующий как в рамках всего физиологического диапазона колебаний уровня гормона, так и за пределами его верхней границы, в том числе и при состоянии выраженного экспериментального тиреотоксикоза.

ВЫВОДЫ

1. В условиях эутиреоидного статуса существует выраженная ($R = 0,82$) положительная связь между уровнем циркулирующего свободного трийодтиронина и величиной тепловой стоимости мышечного сокращения, рассчитанной как отношение прироста температуры мышцы при изотоническом сокращении ($+ΔT^0C$) к единице выполненной в условиях *in situ* внешней работы (мДж); при экспериментальном трийодтирониновом тиреотоксикозе направленность связи ($R = 0,88$) инвертируется, приобретая отрицательный характер.
2. На верхней границе нормы физиологических колебаний уровня трийодтиронина «5,0 ч 7,1 пмоль/л» тепловая стоимость единицы работы (мДж) на 37% выше, чем в начале шкалы концентраций гормона «2,2 ч 4,8 пмоль/л», а при

экспериментальном тиреотоксикозе, наоборот – в конечной области концентраций трийодтиронина («11,9 ч 13,8 пмоль/л») тепловая стоимость мышечного сокращения на 19% ниже, чем в начальном диапазоне «8,8 ч 11,8 пмоль/л».

3. Процесс регуляции трийодтиронином тепловой стоимости мышечного сокращения при состоянии эутиреоза и экспериментальном тиреотоксикозе, по данным показателей вариабельности, ухудшается (соответственно в 2,9 и 2,2 раза) вместе с ростом уровня циркулирующего трийодтиронина.

Перспективы дальнейших исследований связаны с последующим изучением характера связи между показателями энергетики мышечного сокращения и уровнем циркулирующих тиреоидных гормонов при различных моделях экспериментального гипертиреоза и тиреотоксикоза.

Список литературы

1. Болезни щитовидной железы / Ред. Л.И. Браверман. – Москва: Медицина. – 2000. – 250 с.
2. Казаков В.М. Некоторые вопросы патогенеза миопатии у больных тиреотоксикозом / В.М. Казаков // Журнал невропатологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 1989. – № 7. – С. 73 – 79.
3. Шлыкова С.Г Энергетика сокращения скелетной мышцы у белых крыс в ходе развития экспериментального гипертиреоза / С.Г. Шлыкова // Вісник проблем біології і медицини. – 2006. – Вип.3. – С. 39 – 45.
4. Brodie C. Characterization of thyroid hormone effects on Na-K pump and membrane potential of cultured rat skeletal myotubes / C. Brodie, S.P. Sampson // Endocrinology. – 1988. – № 2. – Р. 891 – 897.
5. Connelly T.J. L-thyroxine activates the intracellular Ca²⁺ release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum / Connelly T.J. et. al. // Biochem. Mol. Biol. Int. – 1994. – V. 32, № 3. – Р. 441 – 448.
6. Неруш П.О. Вікові особливості функціонування нервово-м'язової системи щурів за умов гіпертиреозу / П.О. Неруш // Фізіолог. журн. – 2001. – Т.47, №5. – С. 12-17.
7. Родинський О.Г. Механізми функціонування компонентів спинномозкових рефлекторних дуг за умов гіпертирохсінімії / О.Г. Родинський // Архив клинической и экспериментальной медицины. – 2009. – Т. 9, № 1. – С. 131-139.
8. Станішевська Т.І. Характеристика латентних періодів збудження і укорочення м'яза білих щурів залежно від рівня циркулюючого трийодтироніну / Т.І. Станішевська, В.І. Соболев // Фізіолог. журн. – 2012. – Т. 58, № 1. – С. 68 – 75.
9. Короткова Т.П. Энергетика мышечного сокращения при многократной адренергической стимуляции / Т.П. Короткова // Вісник проблем біології і медицини. – 2004. – Вип.4. – С.141 – 145.
10. Соболев В.І. Вплив експериментального атиреозу на енергетику ізометричного скорочення м'яза білого щура (дослідження *in situ*) / В.І. Соболев, Т.В. Москалець // Фізіолог. журн. – 2007. – Т.53. - №5. – С. 86 – 90.
11. Соболев В.І. Теплопродукция изолированной скелетной мышцы белой крысы при экспериментальном гипер- и гипотиреозе / В.І. Соболев // Физиол. журн. СССР. – 1978. – Т.64, N2. – С.177 –183.
12. Соболев В.І. Фазы мышечного термогенеза при экспериментальном гипертиреозе / В.І. Соболев, Н.Т. Лапенко // Физиол. журн. СССР. – 1986. – Т.72, N3. – С. 381 – 384.
13. Султанов Ф.Ф. Гормональные механизмы температурной адаптации / Ф.Ф. Султанов, В.І. Соболев. - Ашхабад: Ылым,1991. – 216 с.
14. Хаскин В.В. Биохимические механизмы адаптации к холоду. Физиология терморегуляции. Руководство по физиологии / В.В. Хаскин. – Л.: Наука, 1984. – С. 237-266.
15. Гольбер Л.М. Тиреотоксическое сердце / Л.М. Гольбер. – М.: Медицина, 1972. – 344 с.
16. Рачев Р.Р. Тиреоидные гормоны и субклеточные структуры / Р.Р. Рачев, Н.Д. Ещенко. – М.: Медицина, 1975. – 296 с.

Станішевська Т.І. Характеристика залежності теплової вартості скорочення м'яза від рівня циркулюючого вільного трийодтироніну у білих щурів за експериментального тиреотоксикозу / Т.І. Станішевська // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2012. – Т. 25 (64), № 3. – С. 196-205.

У експериментах *in situ* показано, що в умовах зутиреоїдного статусу існує виражений ($R = 0,82$) позитивний зв'язок між рівнем циркулюючого вільного трийодтироніну і величиною теплової вартості скорочення м'яза; за експериментального тиреотоксикозу спрямованість зв'язку ($R = 0,88$) інвертується, набуваючи негативного характеру. Встановлено, що на верхній межі норми фізіологічних коливань рівня трийодтироніну "5, 0 ч 7,1 пмоль/л" теплова вартість одиниці роботи м'яза (мДж) на 37% вища, ніж на початку шкали концентрації гормону "2, 2 ч 4,8 пмоль/л", а за експериментального тиреотоксикозу, навпаки - в кінцевій області концентрації трийодтироніну (11, 9 ч 13,8 пмоль/л) теплова вартість скорочення м'яза на 19% нижча, ніж в початковому діапазоні "8, 8 ч 11,8 пмоль/л". Показано, що точність процесу регуляції трийодтироніном теплової вартості скорочення м'яза за стану зутиреозу і експериментального тиреотоксикозу, за даними показників варіабельності, погіршується разом із зростанням рівня циркулюючого трийодтироніну (відповідно в 2,9 і 2,2 рази).

Ключові слова: тиреотоксикоз, трийодтиронін, скелетний м'яз, енергетика.

Stanishevska T.I. Character of dependence of the thermal cost muscular contraction from level of circulatory free triiodothyronine for white rats at experimental thyrotoxicosis / T.I. Stanishevska // Scientific Notes OF Taurida V. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No 3. – P. 196-205.

In experiments it is shown on white rats, that at an euthyroidism between the level of free triiodothyronine and thermal cost of muscular contraction there is positive connection ($R = 0,82$). At an experimental thyrotoxicosis connection ($R = 0,88$) acquires negative character. It is set that on the high bound of physiological level of triiodothyronine (5, 0 ч 7,1 pmol/l) the thermal cost of unit of work of muscle on 37% is higher, than at the beginning of scale of concentrations of hormone (2, 2 ч 4,8 pmol/l), and at an experimental thyrotoxicosis, the thermal cost of muscular contraction below, than in the initial range of level of triiodothyronine (8 on 19%, 8 ч 11,8 pmol/l). It is shown that precision of process of thermal cost regulation at the state of euthyroidism and experimental thyrotoxicosis gets worse at the height of level of triiodothyronine (accordingly in 2,9 and 2,2 time).

Keywords: thyrotoxicosis, triiodothyronine, skeletal muscle, energy.

Поступила в редакцию 19.09.2012 г.

УДК 57.086.8.

ПОРІВНЯЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ЦИТОТОКСИЧНОЇ ДІЇ АКРОЛЕЇНУ ТА ФОРМАЛЬДЕГІДУ НА ТИМОЦИТИ ЩУРА В УМОВАХ *IN VITRO*

Токарчук К.О., Парілова О.О.

Інститут біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України, Київ, Україна
E-mail: katiywa@ukr.net

In vitro на тимоцитах щура досліджено цитотоксичні властивості акролеїну (АКР: 5-15 мкМ) та формальдегіду (ФА: 100-300 мкМ) та їх комбінованої дії на 12-ту і 15-ту години інкубації. Показано, що LD₅₀ для АКР становить 50 мкМ, а для ФА – 400 мкМ. Максимальний приріст загиблих клітин спостерігається для АКР при концентраціях 5-10 мкМ, а для ФА – при 0-100 мкМ. Так, для АКР: при 0-5 мкМ приріст загиблих тимоцитів становить 0,1 %/мкМ, при 5-10 мкМ – 0,7 %/мкМ, при 10-15 мкМ – 1 %/мкМ; для ФА: при 0-100 мкМ – 1 %/мкМ, при 100-200 мкМ – 0,1 %/мкМ, при 200-300 мкМ – 0,4 %/мкМ. Після 12 годин інкубації додаткові 3 години не вплинули на кількість загиблих клітин з АКР, але при дії ФА цей показник збільшився в 1,4 разів. При комбінованій дії АКР та ФА відбувається посилення цитотоксичної дії. За 12 год інкубації їх комбінована дія булавища за математичну суму загиблих клітин при окремій дії кожного з них більш ніж в 1,5 рази. Можна припустити, що при патологічних станах з гіперпродукцією цих альдегідів варто очікувати зростання цитотоксичних проявів.

Ключові слова: тимоцити, формальдегід, акролеїн, протокова цитометрія, цитотоксичність.

ВСТУП

В організмі в процесі метаболізму утворюються різноманітні альдегіди, які в залежності від їхньої концентрації можуть відігравати регуляторну роль, або проявляти токсичні властивості. До таких альдегідів належать формальдегід (ФА) та акролеїн (АКР), які мають різні шляхи метаболізму в організмі та характер цитотоксичної дії.

ФА (CH₂O), як проміжний продукт циклів метиливання, утворюється в процесі одновуглецевого шляху метаболізму, в якому беруть участь такі інтермедиати як S-аденозил-метионін, S-аденозил-гомоцистеїн, L-гомоцистеїн, L-метионін і тетрагідрофолієві кислоти, а джерелом метильних груп є серин і бетаїн [1-4]. Інший шлях утворення ФА відбувається за участі відновленого глутатіону, що неферментативно утворює адукт з ФА – S(гідроксиметил)глутатіон. В ряді перетворень в подальшому знову утворюється глутатіон і вивільняється форміат [5], що включається в тетрагідрофолат і тим самим повертає метильну групу в метаболічний фонд циклів одновуглецевого шляху обміну, в процесі функціонування яких повторно утворюється ФА [6-8].

Основними ендогенними джерелами ФА, окрім вище наведених, є гліцерол і продукти катаболізму адреналіну і фосфатидилхоліну – метиламін і сарказин.

Останні деметилюються семікарбазид чутливою амінооксидазою (SSAO) і саркозин оксидазою. Разом з ФА ці ферменти також утворюють перекис водню [9-12].

Основним ендогенним джерелом АКР (C_3H_4O) є процес перекисного окиснення ліпідів активними формами кисню при оксидативному стресі. Продуктами цього процесу є АКР, малоновий диальдегід і гідропероксиди. Крім цього, АКР може утворюватись за участі амінокислот, зокрема метионіну і треоніну, а також поліамінів [13]. Утворення АКР і його попередника 2-гідроксипропаналю з треоніну опосередковане міелопероксидазою і потребує присутності пероксиду водню та йонів хлору [14]. 3-амінопропаналь є важливим метаболітом в катаболізмі поліамінів сперміну і спермідину, що відбувається за участю Cu^{2+} -залежної амінооксидази і здатний дисоціювати на АКР і аміак [15].

Токсична дія альдегідів зумовлена їх здатністю алкілювати аміногрупи амінокислот та основ нуклеїнових кислот, реагувати з протеїнами і пептидами з подальшим утворенням стійких інтермедиатів у вигляді Шиффових основ або N-гідроксиметильних адуктів, утворювати поперечні метиленові містки між зближеними ділянками в протеїнах [16-17]. Такі реакції призводять до порушення функцій ензимів та інших клітинних структур [18-21,22].

Мутагенні та цитотоксичні властивості цих альдегідів пов'язані з їх здатністю утворювати ДНК-протеїнові поперечні зшивки між NH_2 -групою лізину гістонів і екзоциклічними аміногрупами основ (A і G) ДНК [23].

Велика кількість альдегідів генерується в організмі за різних патологій, наприклад, при хворобах Альцгеймера, Паркінсона, атеросклерозі, діабеті. Особливе місце займає паління, оскільки цей процес призводить до підвищення рівня акролеїну в організмі, а також до накопичення його в концентрації приблизно 80 мкМ в дихальних шляхах [24].

Метою роботи було дослідити та порівняти цитотоксичну дію АКР та ФА, а також визначити характер їх комбінованої дії на тимоцити щура в умовах *in vitro*.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

В роботі використовували наступні реагенти: етидіум бромід (Fisher BioReagents, Канада), поживне середовище RPMI-1640 («Sigma», США), HEPES («Sigma», США), L-глутамін («Sigma», США), акролеїн («Sigma», США), формальдегід (водний розчин формаліну, Альфарус, Україна), інактивована бічача сироватка («Sigma», США).

У дослідах використовували суспензію тимоцитів отриману від щурів лінії Wistar масою тіла 80-100 г. Усі маніпуляції з тваринами приводили згідно з Міжнародною конвенцією роботи з тваринами та Законом України «Про захист тварин від жорсткого поводження». Використовували поживне середовище RPMI-1640, що містило 10мМ HEPES- Na_2CO_3 -буфер (рН 7,3), 200мМ L-глутаміну, 10% ембріональну інактивовану бічачу сироватку, 100 од/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину. Тимоцити виділяли шляхом м'якого перетирання і промивання тканини тимуса поживним середовищем через капронову сітку. Суспензію клітин двічі відмивали поживним середовищем з наступним центрифугуванням 1000 g впродовж 5 хв. Отриману суспензію тимоцитів (2×10^6 клітин) інкубували з АКР (5,

10, 15 мкМ) і ФА (100, 200, 300 мкМ) окремо, та в комбінаціях (5мкМ АКР і 100мкМ ФА, 10мкМ АКР і 200 мкМ ФА, 15 мкМ АКР і 300 мкМ ФА) впродовж 12 та 15 годин при 37°C в 5% CO₂ атмосфері. Вплив альдегідів на тимоцити щура в умовах *in vitro* оцінювали методом протокової цитометрії з використанням флуорохрому етидіум броміду. Кінцева концентрація флуоресцентного барвника в зразку становила 1,5 мкМ. Зразки забарвлювали 15 хв при 25°C і зберігали не більше 1 год при 4°C. Життєздатність тимоцитів під дією ефекторів аналізували на протоковому цитометрі Beckman Coulter (США), визначаючи інтенсивність флуоресценції по FL-3 каналу (620±10 нм). Накопичували 10000 подій для кожного вимірювання.

Статистичну вірогідність результатів оцінювали за t-критерієм Стьюдента в програмі MS Excel 2007. Довірчі інтервали середніх значень визначали шляхом підрахунку стандартного відхилення. Відмінності вважали статистично значущими при p<0,05 [25].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

В даній роботі порівняли цитотоксичну дію ФА і АКР на тимоцити щура. Ці альдегіди викликали залежну від концентрації загибель клітин. Результати даних вказують на те, що цитотоксична дія цих сполук на клітини відрізняється. З наведених на Рис.1 і Рис. 2 результатів видно, що АКР проявляє потужнішу цитотоксичну дію на клітини, ніж ФА. Так, LD₅₀ для ФА становить приблизно 400 мкМ, тоді як для АКР – 50 мкМ. Тобто, для того, щоб отримати однаковий цитотоксичний ефект дії кожного з цих альдегідів, потрібно взяти концентрацію ФА у 8 разів більшу, ніж АКР. Результати представлені без віднімання контролю. Рівень контролю становив (10,8±1,4)% за 12 годин інкубації, (17,1±1,8)% за 15 годин інкубації. За перші декілька годин інкубації значну загибель клітин не спостерігали, тому для спостереження було вибрано 12 і 15 год інкубації.

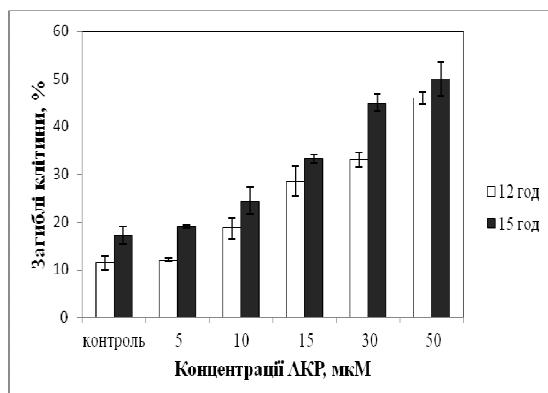


Рис.1. Концентраційна залежність цитотоксичної дії акролеїну без віднімання контролю на тимоцити щура протягом 12 і 15 годин інкубації.

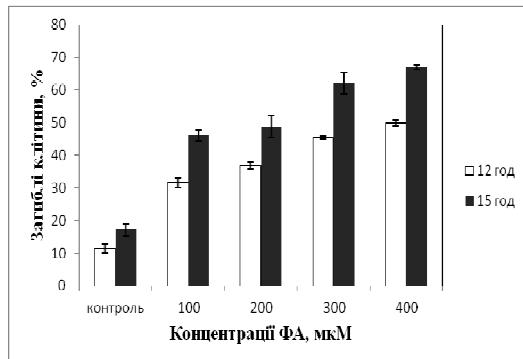


Рис. 2. Концентраційна залежність цитотоксичної дії формальдегіду без віднімання контролю на тимоцити щура протягом 12 і 15 годин інкубації.

Розрахували параметр $Pr(K_{ij})$ - приріст відсотку загиблих клітин при прирості концентрації альдегідів за 15 годин інкубації:

$$Pr(K_{ij}) = \frac{\Delta Z_{ij}}{\Delta K_{ij}} \left[\frac{\%}{\text{мкМ}} \right], \quad (1)$$

де ΔZ_{ij} – приріст відсотку загиблих клітини в діапазоні концентрації K_i - K_{i+1} , ΔK_{ij} – діапазон концентрації (АКР: 0-5, 5-10, 10-15 мкМ; ФА: 0-100, 100-200, 200-300 мкМ), j – номер групи. В результаті розрахунку отримали наступні величини параметру $Pr(K_{ij})$ для АКР: 0,2; 1,24; 1,76 %/мкМ; для ФА: 0,29; 0,3; 0,13 %/мкМ відповідно. Для графічного порівняння характеру змін цього параметру розрахований приріст пронормували на максимальне значення у відповідній групі:

$$Pr(K_{ij})_{\text{norm}} = \frac{Pr(K_{ij})}{Pr(K_{ij})_{\text{max}}}. \quad (2)$$

Результати розрахунків наведені на Рис.3 та свідчать про те, що характер залежності цитотоксичного ефекту від концентрації для АКР та ФА принципово відрізняється. Максимальний приріст цитотоксичної дії АКР проявляє при концентраціях в діапазоні 10-15 мкМ, тоді як ФА – при концентраціях до 100 мкМ.

Для порівняльної оцінки динаміки цитотоксичної дії цих альдегідів розрахували відносний приріст відсотку загиблих клітин від 12-ї до 15-ї години інкубації (рис.4.):

$$Pr(t_j) = \frac{Z_j(15) - Z_j(12)}{Z_j(12)}, \quad (3)$$

де $Z_j(12)$ та $Z_j(15)$ – відсоток загиблих клітин на 12-ту та 15-ту годину інкубації АКР ($j=1$) та ФА ($j=2$).

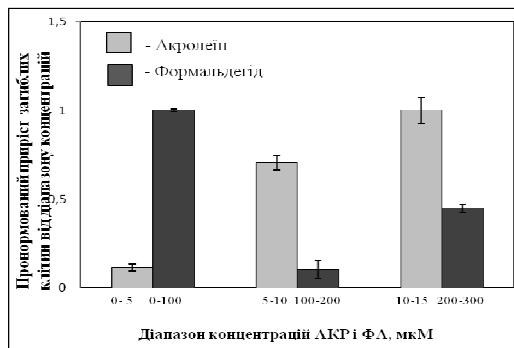


Рис. 3. Залежність пронормованого приросту загиблих клітин від діапазону концентрації акролеїну та формальдегіду на 15-ту годину інкубації тимоцитів.

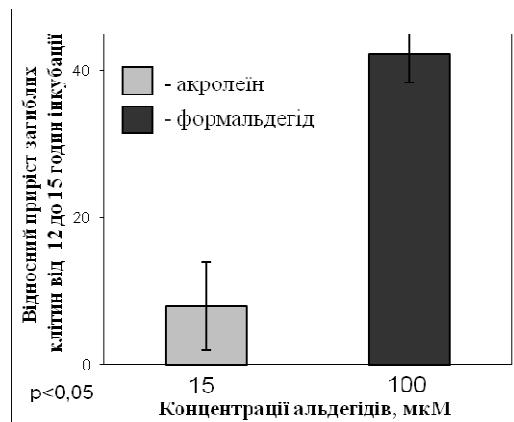


Рис. 4. Відносний приріст загиблих клітин від 12-ї до 15-ї години інкубації з 15 мкМ акролеїну та 100 мкМ формальдегіду.

Для порівняння взяли концентрації альдегідів, при яких спостерігали приблизно однаковий цитотоксичний ефект на клітини: АКР - 15 мкМ ($15\pm1,5$) % загиблих клітин) та ФА - 100 мкМ ($19,2\pm1,6$ %). Відносний приріст загиблих клітин у даному діапазоні часу при дії ФА у 5 разів більший, ніж при дії АКР ($0,42\pm0,06$ та $0,08\pm0,06$ від.од. відповідно, $p<0,05$). Такий результат свідчить про те, що АКР проявляє більш «швидкий» цитотоксичний ефект в порівнянні з ФА, тобто після 12 годин інкубації з АКР додаткові три години не внесли суттєвих змін. При дії ФА, на відміну від АКР, продовження інкубування викликало приріст загиблих клітин в 1,4 рази, що свідчить про більш «повільний» характер цитотоксичної дії.

Відомо, що етидіум бромід проникає через клітинні мембрани тільки мертвих клітин і утворює флуоресцентний аддукт з ДНК. На рис.6 представлені результати протокової цитометрії у вигляді 2-D розподілу клітин між параметром прямого світlorозсіювання (Forward Scattering (FSC)), який залежить від розміру клітини, та інтенсивністю флуоресценції по третьому каналу (FL-3, $\lambda_{ex}=488$ нм, $\lambda_{em}=610-630$ нм). На діаграмі видно, що живі клітини, які мають власну автофлуоресценцію, локалізовані у лівому верхньому кутку залежності. У правій нижній частині

локалізовані клітини, розмір яких менший, а інтенсивність флуоресценції більша, ніж у живих клітинах. Інтенсифікація флуоресценції пов'язана з включенням до клітин барвника, тому характеризує мертві тимоцити. Зменшення розміру мертвих клітин характерно саме для апоптозного шляху загибелі. Тому можна припустити, що при дії ФА та АКР на тимоцити щура відбувається ініціалізація апоптозу клітин.

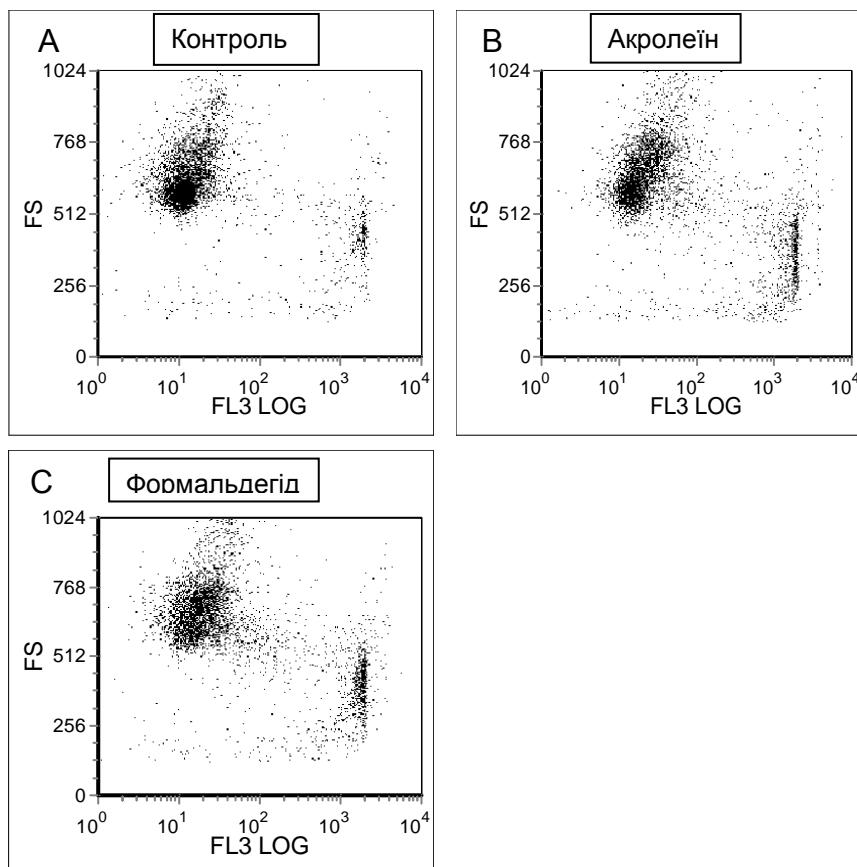


Рис. 4. Результат протокової цитометрії: А – контроль; В – акролеїн (15 мкМ); С – формальдегід (100 мкМ), 12 год інкубації.

Теоретично, при комбінованій дії кількох ефекторів може спостерігатися один з трьох результатів: сумація результату окремої дії ефекторів (адитивність), антагонізм (зниження сумарного ефекту) та синергізм (збільшення сумарного ефекту). Цитотоксична дія альдегідів досить широко досліджується, але дані про характер їх комбінованої дії відсутні. В даній роботі дослідили характер комбінованої дії АКР і ФА на тимоцити щура у таких комбінаціях концентрацій: 5мкМ АКР + 100мкМ ФА, 10мкМ АКР + 200мкМ ФА, 15мкМ АКР + 300мкМ ФА. З наведених вище результатів розрахували математичну суму загиблих клітин, при окремій дії цих альдегідів відповідної концентрації та порівняли розраховану суму з

результатом їх комбінованої дії. Отримані результати, які показано на рис.5, вказують на те, що при комбінованій дії АКР та ФА відбувається суттєве підсилення цитотоксичної дії цих альдегідів при інкубації впродовж 12-ти та 15-ти годин. Так, наприклад, при комбінованій дії цих альдегідів у всіх трьох варіантах концентрацій на 12-ту годину інкубації кількість загиблих клітин була в 1,5 разів більшою за суму результатів окремої дії цих сполук ($p<0,05$).

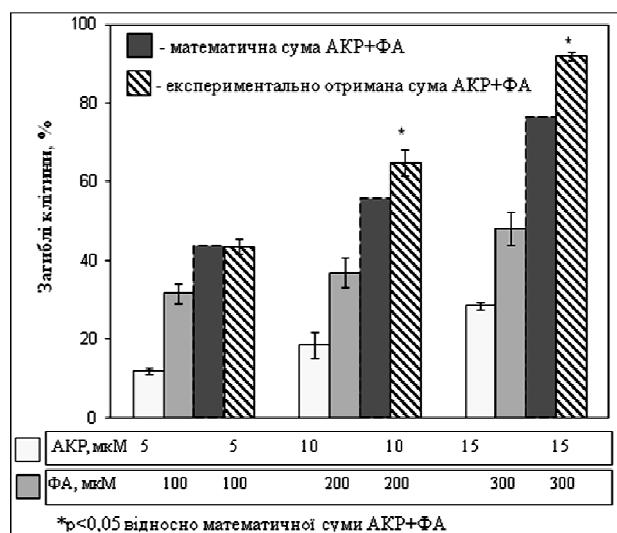


Рис.5. Комбінована цитотоксична дія акролеїну та формальдегіду на тимоцити щура протягом 12 год інкубації.

На основі отриманих результатів можна зробити припущення, що при одночасній інтенсифікації процесів утворення різних альдегідів, наприклад підвищення активності SSAO на фоні підсилення процесів перекисного окиснення ліпідів, буде відбуватися стрімке зростання цитотоксичних ефектів за рахунок комбінованої дії цих активних карбонільних сполук.

ВИСНОВОК

АКР, в порівнянні з ФА, є більш токсичним при дії на тимоцити щура. Так, LD_{50} для АКР становить приблизно 50 мкМ, тоді як для ФА - 400 мкМ. Характер цитотоксичної дії цих альдегідів відрізняється тим, що при збільшенні концентрації ефектора максимальний приріст загиблих клітин спостерігається для АКР при високих концентраціях, а для ФА – при низьких. При комбінованій дії АКР та ФА відбувається суттєве посилення цитотоксичних властивостей. Так, на 12 годину інкубації результат їх комбінованої дії був більш ніж в 1,5 разів вищим за математичну суму загиблих клітин при окремій дії кожного з них. Очевидно, що при розвитку патологічних станів, при яких відбувається посилення утворення цих альдегідів, варто очікувати суттєве зростання цитотоксичних проявів.

Список літератури

1. Barak A.J. Betaine, metabolic by-product or vital methylating agent? / A.J. Barak, D.J. Tuma // Life Sci. – 1983. – Vol. 32, No 7. – P. 771-774.
2. Finkelstein J.D. Methionine metabolism in mammals. Adaptation to methionine excess. / J.D. Finkelstein, J.J. Martin // J. Biol. Chem. – 1986. – Vol. 261, No 4. – P. 1582-1587.
3. Formaldehyde cycle and the natural formaldehyde generators and capturers. / E. Tyihák, L. Albert., Z.I. Németh [et al.] // Acta Biol Hung. – 1998. – Vol. 49, No 2-40. – P. 225-38.
4. Tyihák, E. Formaldehyde cycle and the phases of stress syndrome. / E. Tyihák, L. Trézl and B. Szende // Ann. N. Y. Acad. Sci. USA. – 1998. – Vol. 851. – P. 259-270.
5. Pourmotabbed T. Bovine liver formaldehyde dehydrogenase. Kinetic and molecular properties. / T. Pourmotabbed, M.J. Shih, D.J. Creighton. // J. Biol Chem. – 1989. – Vol. 264, No 29. – P. 17384-17388.
6. Kalász H. Biological role of formaldehyde, and cycles related to methylation, demethylation, and formaldehyde production. / H. Kalász // Mini Rev. Med. Chem. – 2003. – Vol. 3, No 3. – P. 175-92.
7. Liesivuori J. Methanol and formic acid toxicity: biochemical mechanisms. / J Liesivuori, H Savolainen. // Pharmacol. Toxicol. – 1991. – Vol. 69, No 3. – P. 157-63.
8. Szende B. Effect of formaldehyde on cell proliferation and death. / B. Szende, E. Tyihák // Cell Biol Int. – 2010. – Vol. 34, No 12. – P. 1273-82.
9. Дмитренко Н.П. Роль взаимодействия путей метаболизма формальдегида и оксида азота в механизме их токсического действия. II. Токсическое действие оксида азота. / Н.П Дмитренко., А. Холиан // Укр. Біохим. Журнал. – 2005. – Vol. 77, No 5. – P. 5-26.
10. Overbeek R., Larsen N., Selkov E.E., Maltsev M.//1998 WWW URL; <http://www.cme.msu.edu/WIT/>
11. Wagner M.A. Monomeric sarcosine oxidase: Kinetic studies with sarcosine, alternate substrates, and a substrate analogue. / M.A. Wagner, M.S. Jorns // Biochemistry. – 2000. – Vol. 39, No 30. – P. 8825-8829.
12. Yu P.H. Formaldehyde produced endogenously via deamination of methylamine. A potential risk factor for initiation of endothelial injury. / P.H. Yu, D.M. Zuo // Atherosclerosis. – 1996. – Vol. 120, No 1-2. – P. 189-197.
13. Acrolein induces selective protein carbonylation in synaptosomes. / C.F. Mello, R. Sultana, M. Piroddi [et al.] // Neuroscience. – 2007. – Vol. 147. – P. 674-679.
14. Human neutrophils employ the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system to convert hydroxy-amino acids into glycolaldehyde, 2-hydroxypropanal, and acrolein. A mechanism for the generation of highly reactive alpha-hydroxy and alpha,beta-unsaturated aldehydes by phagocytes at sites of inflammation. / M.M. Anderson, S.L. Hazen, F.F. Hsu [et al.] // J. Clin. Invest. – 1997. – Vol. 99. – P. 424-432.
15. O'Brien P.J. Aldehyde sources, metabolism, molecular toxicity mechanisms, and possible effects on human health. / P.J. O'Brien, A.G. Siraki, N. Shangari // Crit. Rev. Toxicol. – 2005. Vol. 35. – P. 609-662.
16. Kitamoto Y. Reevaluation of the reaction of formaldehyde at low concentration with amino acids. / Y. Kitamoto, H. Maeda. // J. Biochem. – 1980. Vol. 87, No 5. – P. 1519-30.
17. Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins : reactions with model peptides. / B. Metz, G.F. Kersten, P. Hoogerhout [et al.] // J. Biol. Chem. – 2004. – Vol. 279, No 8. – P. 6235-43.
18. Formaldehyde: integrating dosimetry, cytotoxicity, and genomics to understand dose-dependent transitions for an endogenous compound. / M.E. Andersen, H.J. Clewell 3rd, E. Bermudez [et al.] // Toxicol. Sci. – 2010. – Vol. 118, No 2. – P. 716-31.
19. Formaldehyde mechanistic data and risk assessment: endogenous protection from DNA adduct formation. / C.C. Conaway, J. Whysner, L.K. Verna [et al.] // Pharmacol. Ther. – 1996. Vol. 71, No 1-2. – P. 29-55.
20. Deng Y. Simultaneous determination of formaldehyde and methylglyoxal in urine : involvement of semicarbazide-sensitive amine oxidase-mediated deamination in diabetic complications. / Y Deng., P.H. Yu. // J. Chromatogr. Sci. – 1999. – Vol. 37, No 9. – P. 317-2.
21. Esterbauer H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. / H. Esterbauer, R.J. Schaur, H. Zollner // Free Radical Biol. Med. – 1991. – Vol. 11. – P. 81-128.
22. Acrolein scavengers : reactivity, mechanism and impact on health. / Q. Zhu, Z. Sun, Y. Jiang [et al.] // Mol. Nutr. Food Res. – 2011. – Vol. 55, No 9. – P. 1375-90.
23. Stevens J.F. Acrolein: sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease. / J.F. Stevens, C.S Maier. // Mol. Nutr. Food Res. – 2008. – Vol. 52, No 1. – P. 7-25.

24. Acrolein-induced cytotoxicity in cultured human bronchial epithelial cells. Modulation by alpha-tocopherol and ascorbic acid. / Mirella Nardini, E.I. Finkelstein, S. Reddy [et al.] // Toxicology. – 2002. – Vol. 170. – P. 173-185.
25. Плохинский М.А. Математические модели в биологии / Плохинский М.А. – М. : Изд-во Моск. ун-та. – 1981. – 265 с.

Токарчук К.О. Сравнительное исследование цитотоксического действия акролеина и формальдегида на тимоциты крыс в условиях *in vitro* / К.О. Токарчук, О.О. Парилова // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2012. – Т. 25 (64), № 3. – С.206-214.

В исследованиях *in vitro* на тимоцитах крыс изучено цитотоксические свойства акролеина (АКР: 5-15 мкМ) и формальдегида (ФА: 100-300 мкМ), а также их комбинированное действие на 12-ый и 15-ый час инкубации. Показано, что LD₅₀ для АКР составляет 50 мкМ, а для ФА – 400 мкМ. Максимальный прирост погибших клеток наблюдается для АКР при концентрациях 5-10 мкМ, а для ФА – при 0-100 мкМ. Для АКР: при 0-5 мкМ прирост погибших тимоцитов составляет 0,1 %/мкМ, при 5-10 мкМ – 0,7 %/мкМ, при 10-15 мкМ – 1 %/мкМ; для ФА: при 0-100 мкМ – 1 %/мкМ, при 100-200 мкМ – 0,1 %/мкМ, при 200-300 мкМ – 0,4 %/мкМ. После 12 часов инкубации дополнительные 3 часа почти не влияли на количество погибших клеток с АКР, но при действии ФА этот показатель увеличился в 1,4 раза. При комбинированном действии АКР и ФА происходит существенное усиление цитотоксических свойств. Так, за 12 часов инкубации результат их комбинированного действия был выше математической суммы погибших клеток при отдельном действии каждого из них приблизительно в 1,5 раза. Поэтому, можно предположить, что при развитии патологических состояний, при которых происходит усиление образования этих альдегидов, стоит ожидать возрастание цитотоксических проявлений.

Ключевые слова: тимоциты, акролеин, формальдегид, проточная цитометрия, комбинированное действие.

Tokarchuk K.O. Comparative study of acrolein and formaldehyde cytotoxic effect on rat thymocytes in vitro / K.O. Tokarchuk, O.O. Parilova // Scientific Notes of Taurida V. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No. 3. – P. 206-214.

It has been investigated the acrolein (ACR: 5-15 μ M) and formaldehyde (FA: 100-300 μ M) cytotoxic effect on rat thymocytes, and also their mutual action during 12 and 15 hrs of incubation. The obtained result indicates that LD₅₀ for ACR is 50 μ M and for FA – 400 μ M. The difference of the cytotoxic action of these aldehydes is that the maximum increment of dead cells is observed for the ACR at 5-10 μ M concentration, and for FA – at 0-100 μ M. For ACR: at concentration of 0-5 μ M increment of dead thymocytes is 0,1 %/ μ M, at 5-10 μ M – 0,7 %/ μ M, at 10-15 μ M – 1 %/ μ M, for the FA: at 0-100 μ M – 1 %/ μ M, at 100-200 μ M – 0,1 %/ μ M, at 200-300 μ M – 0,4 %/ μ M. After 12 hours of incubation with ACR during additional 3 hours the dead cells percentage was same, but with FA this index increased in 1,4 times. Under the ACR and FA mutual action was the significant enhancement of the cytotoxic effect. So, for 12 hours of incubation, the result of their combined effect was greater than mathematical sum in approximately 1,5 times. Therefore, it can be assumed that the development of pathological conditions with hyperproduction of these aldehydes may result in the cytotoxic effects increasing.

Keywords: thymocytes, acrolein, formaldehyde, flow cytometry, combine effect, cytotoxicity.

Поступила в редакцию 11.10.2012 г.

Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского
Серия «Биология, химия». Том 25 (64). 2012. № 3. С. 215-221.

УДК 613.168:591.169.1:595.123

ВЛИЯНИЕ СЛАБЫХ ЭМП КРАЙНИХ ЧАСТОТНЫХ ДИАПАЗОНОВ НА ДИНАМИКУ И ИНФРАДИАННУЮ РИТМИКУ РЕГЕНЕРАТОРНЫХ ПРОЦЕССОВ У ПЛАНАРИЙ *Dugesia tigrina*

Туманянц К.Н., Ярмолюк Н.С.

Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Украина
E-mail: timur328@gmail.com

Показано, что низкоинтенсивные ЭМ факторы крайних частотных диапазонов стимулируют регенерацию планарий, изменяют ИР их регенераторных процессов. Степень стимуляции регенераторных процессов у планарий слабыми ЭМИ крайних частотных диапазонов неодинакова. Более выражено увеличение ИнР, СД у планарий подвергнутых действию ПеМП частотой 8Гц индукцией 50 нТл СНЧ, чем ЭМИ длиной волны 7,1 мм. Изменения многодневной ритмики регенераторных процессов под влиянием ЭМ факторов заключается в перестройке структуры спектров, амплитудно-фазовых взаимоотношений. ЭМИ КВЧ вызывает более выраженные изменения ИР регенераторных процессов у планарий, чем ПеМП СНЧ. Обнаружены различия в биологическом действии изученных факторов могут быть связаны с изменением свойств воды под их влиянием.

Ключевые слова: электромагнитное излучение крайне высокой частоты, переменное магнитное поле сверхнизкой частоты, регенерация, скорость движения, инфрадианская ритмика, планарии.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время широко обсуждается роль воды в реализации биологического действия слабых электромагнитных факторов [1, 2]. Важное значение для развития этих представлений имеют эксперименты на животных, обитающих в воде. В настоящее время накоплен обширный материал о чувствительности к таким воздействиям планарий [3]. Показано, что регенерация этих животных изменяется при действии слабых ЭМП факторов [4–7]. В нашей лаборатории обнаружены изменения регенерации и инфрадианной ритмики (ИР) регенераторных процессов при слабом электромагнитном экранировании [8]. Для развития представлений о роли воды в магнитобиологических исследованиях. Представляет интерес исследования этих процессов при действии ЭМП, обладающих различной проникающей способностью в воде, в частности переменного магнитного поля (ПеМП) сверхнизкочастотной частоты (СНЧ), широко распространенных в биосфере [9], и электромагнитного измерения (ЭМИ) крайне высокой частоты (КВЧ).

В связи с этим целью исследования явилось сравнительное изучение действия низкоинтенсивных ЭМИ СНЧ и КВЧ на динамику и ИР регенераторных процессов планарий *Dugesia tigrina*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использована лабораторная бесполая раса планарий *Dugesia tigrina*, условия их содержания и кормления описаны ранее [10].

Для экспериментов использовали животных длиной $\approx 9 \pm 1$ мм, у которых движение осуществляется за счет ресничек, а не мускулатуры [11].

Планарий отбирали для опыта через три-четыре дня после кормления. Было проведено две серии экспериментов. В первой серии изучалось действие ЭМИ КВЧ, во второй - ПеМП СНЧ. В каждой серии было выделено 2 группы животных по 25 особей в каждой, для которых поддерживался одинаковый режим освещенности и температуры. Первую группу составили контрольные животные, которые содержались в обычных условиях лаборатории и не подвергались никаким воздействиям. Животные II группы I серии подвергались воздействию ЭМИ длиной волны 7,1мм. по 30 минут ежедневно. Планарии экспериментальной группы второй серии наблюдения подвергались влиянию ПеМП частотой 8Гц индукцией 50нТл ежедневно в течение трех часов в сутки (с 8.00 до 11.00 ч.), а остальное время суток они находились в условиях, одинаковых с контрольной группой животных. Продолжительность эксперимента определялась сроком регенерации головного конца тела планарий и составила 16 суток.

Методика изучения регенераторных процессов описана ранее [12].

Определялись следующие параметры регенерации: индекс регенерации (ИнР) [13] и скорость движения (СД) [14], а также их инфрадианная ритмика (ИР).

Для фиксации изображений каждого животного, которые проводились ежедневно в одно и то же время суток, применяли компьютерные технологии анализа изображения, согласно Н.А. Темурьянц.

Для воздействия на животных группы КВЧ использовали терапевтический генератор «Явь-1-7,1» с рабочей длиной волны – 7,1 мм, частотой излучения – 42,2 ГГц, выходной мощностью – 25 мВт, плотностью потока мощности – 10 мВт/см², с непрерывным режимом излучения. Излучатель выполнен в виде рупора с изолирующей насадкой, задающей определенное расстояние от рупора до облучаемой поверхности, габаритные размеры излучателя – 10x20 мм, электропитание аппарата осуществляется от сети переменного тока с напряжением 220 В и частотой 50 Гц. (генераторы «Явь-1» рекомендованы к промышленному выпуску и применению Комитетом по новой технике Министерства здравоохранения СССР (Приказ № 901 от 29.06.87г. по МЗ СССР). Планарии во время воздействия находились в тефлоновой кювете, ко дну которой подводился рупор генератора.

Выбор параметров воздействующего ПеМП осуществлялся на основе оценки их физиологической и геофизической значимости. Выбранная частота 8 Гц является фундаментальной частотой ионосферного волновода [15], а, кроме того, близка к частоте некоторых биоритмов [16]. Величину магнитной индукции (50 нТ) выбирали с таким учетом, чтобы она была значительно выше напряженности естественного ПеМП на данной частоте. Одновременно учитывалось, что для такой интенсивности поля физиологические эффекты надежно воспроизводятся [17]. Опытная установка состояла из катушек индуктивности диаметром 1 м и

низкочастотного генератора ГРМ-3. Для контроля гармонического колебания использовался одноканальный лучевой осциллограф С1-114/1.

Проверка полученных данных на закон нормального распределения позволила применить параметрический метод в статистической обработке и анализе материала исследования. Вычисляли среднее значение исследуемых величин и ошибку средней. Оценку достоверности наблюдаемых изменений проводили с помощью t-критерия Стьюдента. За достоверную принимали разность средних при $p<0,05$. Расчеты и графическое оформление полученных в работе данных проводились с использованием программы Microsoft Excel [18].

Эффективность экспериментального воздействия определяли путем вычисления коэффициента эффективности (КЭ). Каждое из измеряемых значений ИНР и СД как в опыте ($R_{\text{Э}}$), так и в контроле ($R_{\text{к}}$) является результатом усреднения измерений на 25 животных. Изменение ИНР и СД в эксперименте рассчитывали по коэффициенту эффективности:

$$K\mathcal{E} = \frac{(R_{\text{Э}} - R_{\text{к}}) \pm (\delta_{\text{Э}} + \delta_{\text{к}})}{R_{\text{к}} \pm \delta_{\text{к}}} \cdot 100\%,$$

где $R_{\text{к}}$ и $R_{\text{Э}}$ – индекс регенерации или скорость движения в контрольной и экспериментальной группах, $\delta_{\text{Э,к}}$ – стандартные ошибки измерений в опыте и контроле.

В качестве основного метода анализа продолжительности периодов и амплитудно-фазных характеристик регенераторных процессов использовали быстрое преобразование Фурье, обеспечивающее разложение временного ряда на конечное число элементарных периодических компонент, и программу косинор-анализа (решение систем линейных уравнений методом Крамера), дающие полное представление о структуре физиологических ритмов [19].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали проведенные исследования, слабые ЭМИ крайних частотных диапазонов стимулируют регенерацию планарий, изменяют их ИР. КЭ, рассчитанный как по ИНР, так по СД максимально возрастают при обоих воздействиях на 2-3 сутки воздействия. В дальнейшие сутки эксперимента стимулирующий эффект ЭМ факторов снижается и на 16–17 сутки достигает нуля. В обоих случаях отмечена положительная корреляционная связь между СД и ИНР.

Однако, степень стимуляции регенераторных процессов у планарий слабыми ЭМИ крайних частотных диапазонов неодинакова. Более выражено увеличение и ИНР, и СД у планарий, подвергнутых действию ПемП СНЧ, чем ЭМИ КВЧ. Если у животных, подвергнутых действию ПемП, КЭ, рассчитанные по ИНР и СД возрастают на 3 сутки на 37% и 47%, то при действии ЭМИ КВЧ эти коэффициенты возрастают лишь на 21% и 10% соответственно (рис. 1, 2).

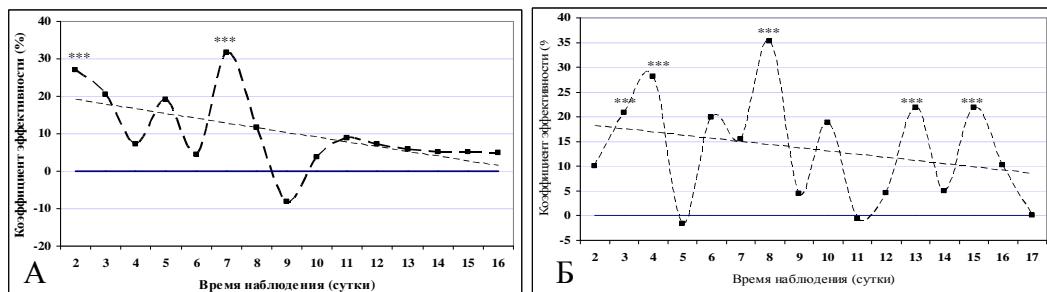


Рис. 1. Динамика ($\bar{x} \pm S \bar{x}$) коэффициентов эффективности (%) ЭМИ КВЧ, рассчитанных по индексу регенерации (А) и скорости движения (Б) планарий.
Примечание: * – достоверность различий относительно контрольных значений *** – ($p < 0,05$).

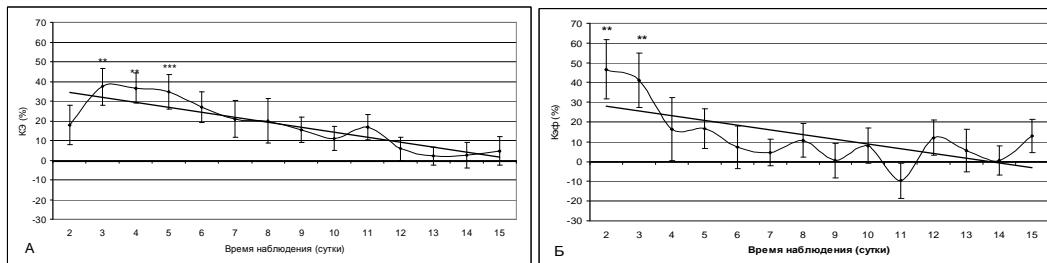


Рис. 2. Динамика ($\bar{x} \pm S \bar{x}$) коэффициента эффективности (%) ПемП СНЧ, рассчитанного по индексу регенерации (А) и скорости движения (Б) планарий.
Примечание. * – достоверность различий относительно контрольных значений: ** – ($p < 0,01$); *** – ($p < 0,05$).

Таким образом, ПемП 8 Гц интенсивностью 50 нТл обладает более выраженным стимулирующим действием на регенерацию планарий, чем ЭМИ КВЧ.

Как показали проведенные исследования низкоинтенсивные ЭМ факторы крайних частотных диапазонов вызывают изменения и ИР, которые заключаются в перестройке структуры спектров, амплитудно – фазовых взаимоотношений.

При действии ПемП наблюдается обеднение спектров ИнР и СД: перестает выявляться период $\approx 3^d$, амплитуды большинства других ритмов оказывается несколько сниженными (рис. 3).

При воздействии ЭМИ КВЧ имеет место более выраженные изменения ИР: перестает выявляться период $4,57^d$ в спектрах обоих показателей, а амплитуда других выделенных ритмов резко снижается, особенно в спектре СД, когда они близки к 0 (рис. 4).

Таким образом, под влиянием низкоинтенсивных ЭМ факторов изменяется ИР регенераторных процессов у планарий. Но более выражены эти изменения под влиянием ЭМИ КВЧ.

Способность ПемП и ЭМИ КВЧ изменять ритмические процессы обнаруженные в многочисленных исследованиях.

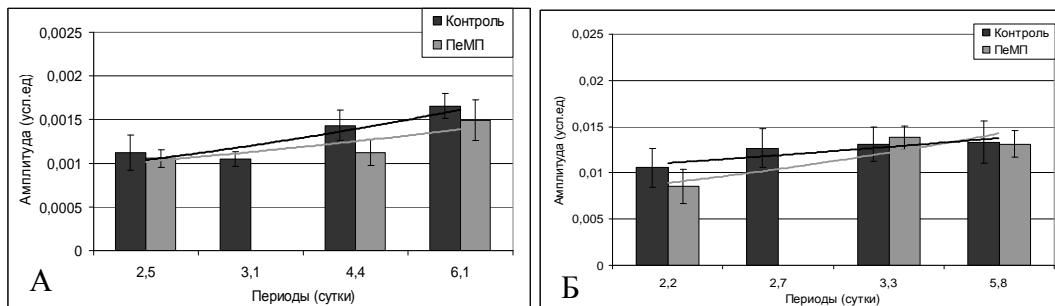


Рис. 3. Спектры периодов инфрадианных ритмов индекса регенерации (А) и скорости движения (Б) планарий при действии ПемП СНЧ.

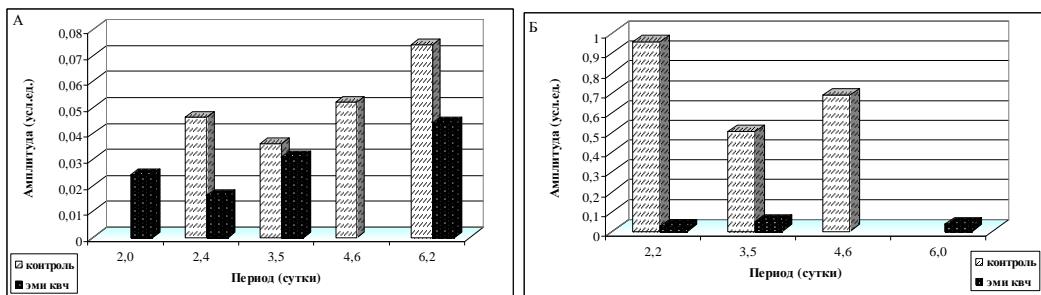


Рис. 4. Спектры периодов инфрадианных ритмов индекса регенерации (А) и скорости движения (Б) интактных планарий и животных, подвергнутых действию ЭМИ КВЧ.

Так экспериментах на крысах, моллюсках показано, что ЭМИ крайних частотных диапазонов изменяет инфрадианную ритмику разнообразных физиологических процессов [20–22], причем во всех случаях ПемП СНЧ изменяло параметры ритмики более выражено, чем ЭМИ КВЧ. Нами на животных, ведущих водный образ жизни, обнаружен противоположный эффект: под влиянием ЭМИ КВЧ многодневная ритмика регенераторных процессов претерпевает более выраженные изменения. Возможно, такие особенности действия ЭМИ КВЧ на планарий связаны с неодинаковыми изменениями свойств воды под влиянием этих факторов. Дальнейшие исследования позволят расширить эти представления.

ВЫВОДЫ

1. Низкоинтенсивные ЭМ факторы крайних частотных диапазонов стимулируют регенерацию планарий, изменяют ИР их регенераторных процессов.
2. Степень стимуляции регенераторных процессов у планарий слабыми ЭМИ крайних частотных диапазонов неодинакова. Более выражено увеличение ИР, СД у планарий подвергнутых действию ПемП СНЧ, чем ЭМИ КВЧ.
3. Изменения многодневной ритмики регенераторных процессов под влиянием ЭМ факторов заключается в перестройке структуры спектров, амплитудно-фазовых взаимоотношений.

4. ЭМИ КВЧ вызывает более выраженные изменения ИР регенераторных процессов у планарий, чем ПемП СНЧ.

Список литературы

1. Дроздов А.В. О колебательных ритмах в воде и биоритмах / А.В. Дроздов, Т.П. Нагорская // Материалы IX Международной крымской конференции «Космос и биосфера». – Алушта, 2011 г. – С. 20–22.
2. Цетлин В.В. Эффекты слабых полей и излучений природных факторов окружающего пространства на водную среду / В.В. Цетлин, С.С. Мойса // VI Международного конгресса «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине» Санкт-Петербург, Россия, 02-06 июля 2012. – С. 35.
3. Использование планарий для изучения действия экологических факторов / Н.А. Темурьянц, Н.А. Демцун, Н.С. Ярмолюк [и др.] // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – Том 22 (61). – 2009. – № 1. – С. 78–86
4. Леднев В.В. Биоэффекты слабых комбинированных постоянных и переменных магнитных полей / В.В. Леднев // Биофизика. – 1996. – Т. 41, Вып. 1. – С. 224–231.
5. Новиков В.В. Влияние слабых и сверхслабых комбинированных постоянного и низкочастотного переменного магнитных полей и миллиметровых волн низкой интенсивности на регенерацию планарий *Dugesia tigrina* / В.В. Новиков, И.М. Шейман, А.В. Клюбин [и др.] // Биофизика – 2007. – Т.52, Вып. 2. – С. 372–375.
6. Белова Н.А. Первичные мишени во взаимодействии слабых магнитных полей с биологическими системами: автореф. дисс. на соискание учен. степени док. биол. наук : спец. 03.01.02 «Биофизика» / Н.А. Белова – Пущино, 2011. – 43 с.
7. Jenrow K.A. Weak extremely low frequency magnetic field – induced regeneration anomalies in the planarian *Dugesia tigrina* / K.A. Jenrow, C.H. Smith, A.R. Liboff // Bioelectromagnetics. – 1996. – Vol. 17. – P. 467–474.
8. Темурьянц Н.А. Сезонные различия регенерации планарий в условиях многодневного электромагнитного экранирования / Н.А. Темурьянц, Н.А. Демцун // Биофизика. – 2010. – Т.55, вып. 4. – С. 710–714.
9. Владимирский Б.М. Влияние солнечной активности на биосферу – ноосферу (Гелиобиология от А.Л.Чижевского до наших дней). / Б.М. Владимирский, Н.А. Темурьянц – М.: Изд-во МНЭПУ, 2000. – 374 с.
10. Демцун Н.А. Динамика скорости движения планарий, регенерирующих в условиях электромагнитного экранирования / Н.А. Демцун, Н.А. Темурьянц, М.М. Баранова // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2009. – Т. 22 (61), № 2. – С. 24–32.
11. Шмидт-Ниельсен К. Физиология животных: приспособление и среда / Шмидт-Ниельсен К. – М: «Мир», 1982. – Т.2. – С. 555–643.
12. Демцун Н.А. Влияние низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ на регенерирующие планарии *Dugesia tigrina* / Н.А. Демцун, К.Н. Туманянц, Н.А. Темурьянц // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология. Химия». – 2009. – Т.22 (61), №2. – С. 33–40.
13. Морфогенез планарий *Dugesia tigrina* / И.М. Шейман, Н.Д. Крещенко, З.В. Седельников [и др.] // Онтогенез, 2004. – Т. 35, №4 – С. 285–290
14. Патент 48095 України МПК51 А 01 К 61/00. Спосіб визначення швидкості руху інтактних і регенеруючих планарій / Темур'янц Н.А., Баранова М.М., Демцун Н.О.; заявник та власник Таврійський національний університет ім. В.І. Вернадського. – № U200908540; заявл.: 13.08.2009; опубл. 10.03.2010, Бюл. № 5.
15. Schumann W.O. Über die Dämpfung der elecromagnetischen Eigenwirkungen des Systems Erde-Luft-Ionosphäre / W.O. Schumann // Naturwissenschaft. – 1982. – No 7a. – P. 250–254.
16. Ашофф Ю. Биологические ритмы / Ашофф Ю. – М. : Мир, 1984. – Т. 1. – 176 с.

17. Темурьянц Н.А. Влияние слабых переменных магнитных полей крайне низких частот на инфрадианную ритмику симпато-адреналовой системы крыс / Н.А. Темурьянц, В.Б. Макеев, В.И. Малыгина // Биофизика. – 1992. – Т. 37, №4. – С. 653–655.
18. Боровиков В. Statistica. Искусство анализа данных на компьютере: Для профессионалов. 2-е изд. / Боровиков В. – СПб.: Питер, 2003. – 688 с.
19. Емельянов И.П. Формы колебания в биоритмологии / Емельянов И.П. – Новосибирск: Наука, 1976. – 127 с.
20. Функциональная асимметрия у человека и животных: влияние низкоинтенсивного электромагнитного излучения миллиметрового диапазона / [Е.Н. Чуян, Н.А. Темурьянц, В.П. Пономарева и др.] – Симферополь. – 2004. – 440 с.
21. Мартынюк В.С. Корреляция биофизических параметров биологически активных точек и вариаций гелиогеофизических факторов / В.С. Мартынюк, Н.А. Темурьянц, О.Б. Московчук // Биофизика. – 2001. – Т. 46, № 5. – С. 905–909.
22. Костюк А.С. Изменение инфрадианной ритмики болевой чувствительности моллюсков *Helix albescens* при электромагнитном экранировании / А.С. Костюк, Н.А. Темурьянц // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология. Химия» – 2009. – Т. 22 (61), №4. – С. 27–34.

Туманянц К.М. Вплив слабких ЕМП вкрай частотних діапазонів на динаміку і інфрадіанну ритміку регенераторних процесів у планарії *Dugesia tigrina* / К.М. Туманянц, Н.С. Ярмолюк // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2012. – Т. 25 (64), № 3. – С. 215-221.

Показано, що низькоінтенсивного ЕМ фактори крайніх частотних діапазонів стимулюють регенерацію планарій, змінюють IP їх регенераторних процесів. Ступінь стимуляції регенераторних процесів у планарії слабкими ЕМП крайніх частотних діапазонів неоднакова. Більш виражено збільшення ІНР, СД у планарії під дією ЗМП частотою 8Гц індукцією 50 нТл СНЧ, ніж ЕМВ довжиною хвилі 7,1 мм. Зміни багатоденної ритміки регенераторних процесів під впливом ЕМ чинників полягає в перебудові структури спектрів, амплітудно-фазових взаємин. ЕМІ КВЧ викликає більш виражені зміни IP регенераторних процесів у планарії, ніж ЗМП СНЧ. Виявлені відмінності в біологічному дії вивчених факторів можуть бути пов'язані зі зміною властивостей води під їх впливом

Ключові слова: електромагнітне випромінювання вкрай високої частоти, змінне магнітне поле наднизької частоти, регенерація, швидкість руху, інфрадіанна ритміка, планарії.

Tumanyants K.N. Influence of weak electromagnetic fields of extreme frequency ranges on dynamics and infradian rhythms of regeneration at planary *Dugesia tigrina* / K.N. Tumanyants, N.S. Yarmolyuk // Scientific Notes OF Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No 3. – P. 215-221.

It is shown that low-intensive electromagnetic factors of extreme frequency ranges stimulate regeneration of planarian, change infradian rhythms of their regeneratorny processes. Extent of stimulation of regeneratorny processes at planarian weak electromagnetic radiations of extreme frequency ranges isn't identical. The increase in an index of regeneration, speed of movement at planarian treated to action of a variation magnetic field by frequency of 8 Hz by an induction 50 nTl, than electromagnetic radiation in length of a wave 7,1 mm is more expressed. Changes of rhythms of regeneratorny processes lasting many days under the influence of EM of factors consists in reorganization of structure of ranges, peak and phase relationship. Electromagnetic radiation of the highest frequency causes more expressed changes of infradian rhythms of regeneratorny processes in planarian, than a variation magnetic field of ultralow frequency. Distinctions in biological action of the studied factors are found can be connected with change of properties of water under their influence.

Keywords: electromagnetic radiation of the highest frequency, variation magnetic field of ultralow frequency, regeneration, speed of movement, infradian rhythms, planarian.

Поступила в редакцию 19.09.2012 г.

УДК 591.112

ТИПОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ ЖИВОТНЫХ

Чуян Е.Н., Древетняк Н.А., Богданова О.Д., Раваева М.Ю., Трибрат Н.С.

Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Украина
E-mail: elena-chuyan@rambler.ru

Методом лазерной допплеровской флюметрии (ЛДФ) выявлены индивидуально-типологические особенности показателей микротоков крови крыс. В результате исследования выделено 3 типа ЛДФ-грамм: апериодический, монотонный с низкой и высокой перфузией. Анализ флаксмоций микротоков и показателей тепловой пробы показал, что наиболее высокой степенью сбалансированности регуляторных процессов микроциркуляции обладают животные с апериодическим типом ЛДФ-грамм.

Ключевые слова: микроциркуляция крови, метод лазерной допплеровской флюметрии, крысы, тепловая пробы, апериодический тип, монотонный тип с низкой перфузией, монотонный тип с высокой перфузией.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что, независимо от цели исследования, в любой экспериментальной выборке существуют особи более или менее сенситивные к воздействию, а разница в чувствительности может быть настолько значительна, что усреднение приведет к нивелированию результата. Становится очевидным, что типологическое разделение перспективно для адекватной оценки состояния физиологических систем в норме и при нагрузке, что подтверждается многочисленными исследованиями в различных сферах физиологии и экспериментальной медицины [1-8]. В то же время показано, что типологические особенности человека и животных находятся в тесной корреляции с различными физиологическими показателями [3, 7], в том числе и с показателями системы микроциркуляции [9-10], которая является важнейшим звеном энергетического и трофического обмена. Состоянием микротоков определяется гомеостаз и адаптационные резервы организма. Нарушения в данном звене сосудистой системы лежат в основе множества патологических состояний или коррелируют с ними [11-14]. Поэтому большой интерес представляет изучение компонентов микроциркуляции и ее регуляции в различных условиях как диагностического, так и прогностического аспекта в оценке функционального статуса организма [14].

Одним из перспективных и успешно применяемых диагностических методов исследования тканевого кровотока является лазерная допплеровская флюметрия (ЛДФ), которая позволяет выявить не только индивидуальную изменчивость микроциркуляции, но и исследовать механизмы ее регуляции [15-16]. Данный метод давно и успешно используется для исследования тканевой микроциркуляции у

людей, что отражено и в наших работах [10, 17]. Однако у животных метод ЛДФ в хронических экспериментах практически не используется, в частности, в исследовательских лабораториях на территории Украины, что значительно ограничивает физиологические исследования. В то же время, животные являются незаменимым объектом для моделирования различных адаптационных состояний, в том числе и стресса, который в большинстве случаев невозможно воспроизвести у человека. Кроме того, в отечественной и зарубежной литературе отсутствуют данные о выявленных с помощью ЛДФ-метрии типологических особенностях микроциркуляции крыс, что и явилось целью нашего исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на 140 белых беспородных крысах-самцах массой 120-140 г, полученных из опытно-экспериментального питомника Института биологии Харьковского национального университета им. В.Н. Каразина. До начала исследования все животные были адаптированы к условиям вивария.

Микроциркуляторные процессы у животных изучали с помощью метода ЛДФ [16]. Так как ЛДФ является высокочувствительным методом, то, для сведения к минимуму внешних помех, крысу на время записи помещали в прозрачный пенал из оргстекла, ограничивающий подвижность животного. Размер пенала регулировался индивидуально и подбирался так, чтобы животное могло свободно дышать и ни одна часть тела не была плотно зажата. Хвосты фиксировались на ровной поверхности на одной линии с телом в горизонтальном положении тканевым пластирем. Оптоволоконный зонд прибора «ЛАКК-02» также фиксировался тканевым пластирем перпендикулярно у основания хвоста. Запись ЛДФ-сигнала велась, когда животное сидело неподвижно и спокойно.

ЛДФ-метрию проводили при помощи лазерного анализатора кровотока «ЛАКК-02» во втором исполнении (производство НПП «Лазма», Россия) с использованием программы LDF 2.20.0.507WL. Исследование базального кровотока проводилось в течение 6 минут.

С помощью компьютерной программы обработки ЛДФ-граммы определяли следующие основные статистические показатели:

- параметр микроциркуляции (ПМ; перф. ед.) – отражает степень перфузии в единице объема ткани за единицу времени и позволяет проследить ее динамику при реакции кровотока на различные воздействия [15]; определяется количеством и скоростью движения эритроцитов, тканевым гематокритом, а также количеством функционирующих капилляров [12, 16, 19, 20];

- среднее квадратическое отклонение (флакс, СКО, σ ; перф.ед.) – средние колебания перфузии относительно среднего арифметического значения ПМ, отражающее среднюю модуляцию кровотока во всех частотных диапазонах [12, 16];

- Кв (%) – коэффициент вариации, характеризующий соотношение флакса к среднему уровню перфузии; указывает на процентный вклад вазомоторного компонента в общую модуляцию тканевого кровотока: чем он выше, тем больше вазомоторная активность сосудов [18].

Расчетные параметры ПМ, СКО и Кв дают общую оценку состояния микроциркуляции крови. Однако наиболее существенным является не столько измерение скорости движения эритроцитов, сколько временная изменчивость потока эритроцитов [19]. Интенсивность потока крови при этом является результатом суперпозиции основных гемодинамических ритмов [20]. Вейвлет-преобразование позволяет точно и корректно проводить анализ нормированных характеристик ритмов колебаний кровотока: эндотелиального, нейрогенного, миогенного, дыхательного и пульсового компонентов [16, 19, 21].

Ввиду разброса колебаний амплитуд ритмов (А), их нормированные характеристики анализировались по формуле [15, 16]:

$$\text{Анорм} = A/3\sigma, \quad (1)$$

где А – амплитуда колебаний в диапазоне от 0,02 – 2 Гц.

Такая нормировка позволяет перейти к безразмерным величинам и исключить влияние нестандартных условий проведения исследований.

Вклад различных ритмических составляющих оценивался по мощности их спектра (Р) в процентном отношении к общему спектру фраксмоций [16]:

$$P = A\varphi (n, m, d, c)^2 / (A\varphi^2 + A\eta^2 + A\mu^2 + A\delta^2 + A\sigma^2) * 100\%, \quad (2)$$

где $A\varphi$ – амплитуды эндотелиальных, $A\eta$ – нейрогенных, $A\mu$ – миогенных, $A\delta$ – дыхательных, $A\sigma$ – пульсовых ритмов колебаний тканевого кровотока.

Регуляция в системе микроциркуляции обусловлена взаимодействием низкочастотных и высокочастотных компонентов спектра. Наиболее низкая частота (0,0095-0,02 Гц) характерна для эндотелиальных колебаний, обусловленных периодическими сокращениями цитоскелета эндотелиоцитов. Эндотелиальные колебания отражают воздействие гуморально-метаболических факторов на микрососудистое русло и характеризуют состояние нутритивного кровотока [15]. Колебания в частотах 0,07-0,15 Гц, миогенные колебания, обусловлены периодической активностью гладкомышечных волокон артериол, приводящих к изменению диаметра их просвета (вазомоции) [16]. На такую периодичность констрикции и дилатации микросудов накладываются нейрогенные колебания (0,02-0,046 Гц), отражающие симпатическую регуляторную активность [16, 19].

К высокочастотным колебаниям относятся дыхательные (0,15-0,4 Гц) и пульсовые (0,8-0,16 Гц) колебания. Дыхательные колебания представлены периодическими изменениями давления в венозном отделе сосудистого русла, вызываемыми дыхательными экскурсиями грудной клетки [12]. Пульсовые колебания кровотока обусловлены перепадами внутрисосудистого давления, которые в большей или меньшей степени синхронизированы с кардиоритмом [15]. Эндотелиальный, миогенный и нейрогенный компоненты относятся к активным механизмам регуляции процессов микроциркуляции, пассивными являются дыхательные и пульсовые влияния [15, 19].

Таким образом, математический аппарат Вейвлет позволяет наилучшим образом выявлять периодичность процессов микроциркуляции, представленных в ЛДФ-граммме [16].

Соотношение активных модуляций кожного кровотока, обусловленных эндотелиальным, миогенным, нейрогенным механизмами и дополнительных

парасимпатических влияний на него рассчитывалось как индекс флаксмоций, или индекс эффективности микроциркуляции (ИЭМ) [16].

В ряде работ [9, 19, 22, 23] установлено, что оценка базального кровотока и его амплитудно-частотных характеристик может быть существенно дополнена нагрузочным тестированием для исследования особенностей регуляции микроциркуляторного русла, а также для выявления и верификации типологических особенностей. Для этого в экспериментальной практике широко применяют функциональные пробы, в частности – тепловую. Она проста, довольно информативна и дает возможность выявить реактивность микрососудов [16]. В нашем исследовании тепловая проба представляла собой локальный нагрев исследуемого участка ткани с 32 до 40-41 °C с помощью модуля ЛАКК-тест (производство НПП «Лазма», Россия) с двумя источниками лазерного излучения, работающими на длине волны 0,8 мкм [16].

При анализе результатов тепловой пробы учитывали:

- ПМ исх. (перф.ед.) - исходный уровень перфузии;
- ПМ max (перф.ед.) - максимальный уровень перфузии при нагреве;
- ПМ max-ПМ исх. (перф.ед.) - прирост кровенаполнения как разность между максимальной и первоначальной перфузией;
- РКК (%) - резерв капиллярного кровотока - выраженное в процентах отношение максимальной перфузии к исходной:

$$РКК = [(ПМ max - ПМ исх.)/ ПМ исх.] \times 100\% \quad (3)$$

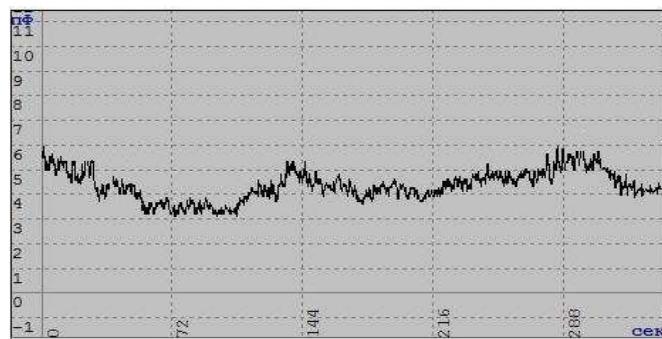
- $T_{1/2}$ (сек) - период полувосстановления, который определяли как время возврата перфузии от ПМ max в наивысшей точке графика до исходного уровня.

Статистическая обработка данных проводилась путем вычисления среднего значения исследуемых величин (M), средней ошибки (m) для каждого показателя. Исследуемые величины показателей подчинялись закону нормального распределения, оценка достоверности межгрупповых различий проводилась с помощью критерия Стьюдента. Межгрупповые различия считались достоверными при $p \leq 0,05$. Для выявления связей между показателями микроциркуляции использовался метод кластерного анализа с построением дендрограмм, являющейся многомерным статистическим методом, позволяющим находить скрытые связи как внутри функциональных систем, так и между ними [24].

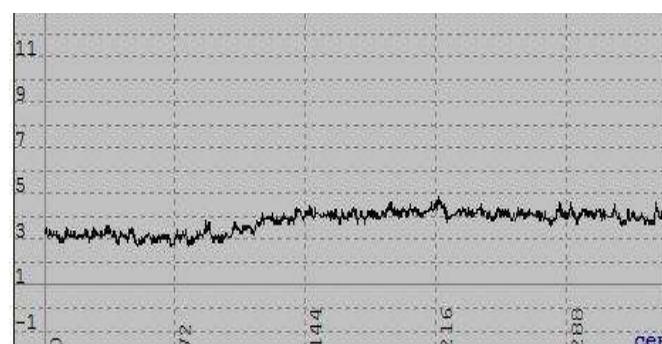
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении микроциркуляторных процессов в результате ЛДФ-метрии исследуемой популяции крыс обнаружены значительные отличия в нативных записях, заключающиеся в различной величине средней перфузии и ее вариабельности во времени – аperiодичности или монотонности (рис. 1).

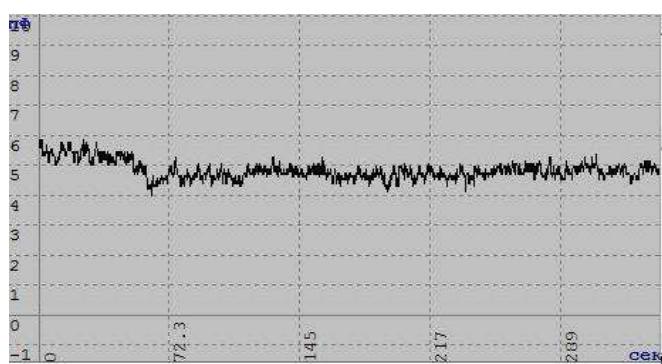
Это подтверждается достоверными различиями в базовых неосцилляторных показателях M , СКО и K_b , а также показателя ИЭМ, что согласуется с исследованиями у людей [9, 10, 19]. Использование этих параметров дало возможность разделить все ЛДФ-граммы на три микрогемодинамических типа: аperiодический (44,53%), монотонный с низкой перфузией (31,25%) и высокой перфузией (24,22%) (рис. 2).



А



Б



В

Рис.1. Нативная запись ЛДФ-грамм:
А – у крыс с аperiодическим типом ЛДФ-грамм;
Б – у крыс с монотонно низким типом ЛДФ-грамм;
В – у крыс с монотонно высоким типом ЛДФ-грамм.

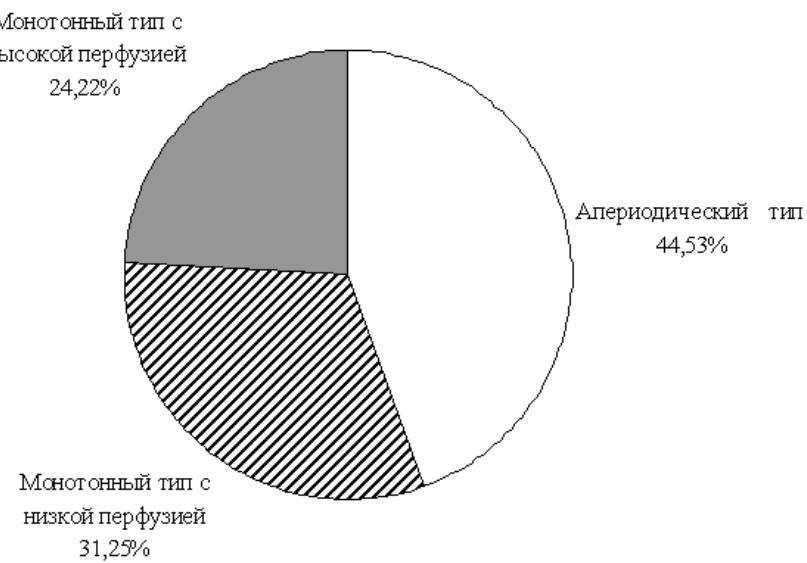


Рис. 2. Распределение типов ЛДФ-грамм в экспериментальной группе крыс (в %).

Однако при сравнении аналогичных типов ЛДФ-грамм у людей наблюдается более высокий уровень перфузии, СКО и ИЭМ по отношению к данным показателям у крыс, что может быть объяснено меньшим кровенаполнением тканей. В то же время, уровень Kv у крыс значительно выше уровня данного показателя у человека, свидетельствующее о высокой вариабельности микротоков у крыс.

Для апериодического типа ЛДФ-грамм характерна сравнительно высокая степень кровенаполнения микроциркуляторного русла, что подтверждается уровень перфузии, равный $4,16 \pm 0,13$ перф. ед. Также у крыс этой группы было отмечено самое высокое значение Kv ($22,67 \pm 0,78\%$) среди всех групп и уровень флакса ($0,92 \pm 0,02$ перф. ед.) (табл. 1), который, как известно [12, 16, 19], характеризует временную изменчивость перфузии и отражает среднюю модуляцию кровотока во всех частотных диапазонах (рис. 1-А). Таким образом, для апериодической ЛДФ-граммы свойственны четко выраженные высокоамплитудные нерегулярные колебания значений показателя перфузии.

В то время как базовые показатели, такие как уровень перфузии, Kv и СКО дают лишь общее представление о состоянии микротоков, значения амплитудно-частотных характеристик и процентный вклад в общую мощность спектра каждой из них позволяют выявить состояние регуляторных механизмов [12, 15, 16, 19].

Таблица 1.
Показатели микроциркуляции у крыс с разными типами ЛДФ-грамм (M ± m)

№ группы	Типы ЛДФ-грамм	Показатели			
		Параметр микроциркуляции, M, перф.ед.	Уровень флакса, СКО, перф.ед.	Коэффициент вариации Kv, %	Индекс эффективности микроциркуляции, ИЭМ
1	Апериодический (n=63)	4,16±0,13	0,92±0,02	22,67±0,78	1,48±0,04
2	Монотонный с низкой перфузией (n=34)	3,04±0,12 p _{1,2} ≤0,05	0,42±0,02 p _{1,2} ≤0,001	13,53±0,4 p _{1,2} ≤0,05	1,14±0,05 p _{1,2} ≤0,05
3	Монотонный с высокой перфузией (n=43)	6,2±0,28 p _{1,3} ≤0,001 p _{2,3} ≤0,001	0,53±0,01 p _{1,3} ≤0,001 p _{2,3} ≤0,05	8,54±0,59 p _{1,3} ≤0,001 p _{2,3} ≤0,001	0,87±0,03 p _{1,3} ≤0,001 p _{2,3} ≤0,05

Примечание: p₁₋₃ – достоверность отличий при сравнении значений показателей в группах 1-3 соответственно.

При анализе амплитудно-частотных характеристик ЛДФ-грамм данного типа выявлено существенное доминирование низкочастотных компонентов флюктуации тканевого кровотока. Так, среднее значение амплитуд эндотелиального ритма составило 14,41±0,39 перф.ед., нейрогенного - 13,98±0,32 перф.ед., миогенного – 11,23±0,45 перф.ед. (табл. 2). Наиболее низкочастотные эндотелиальные (0,01 Гц) колебания, обусловлены выбросом основного эндотелиального метаболита NO, являющегося мощным вазодилататором. Выброс NO включен в физиологическую регуляцию мышечного тонуса и играет важную роль в регуляции давления и распределения потока крови [25]. По мере повышения или снижения амплитуд данных колебаний можно судить об уровне нутритивного кровотока [26]. Амплитуды нейрогенных колебаний отражают активность со стороны симпатических адренергических нервных волокон, их влияние локализуется на гладкомышечных стенках микрососудов. Миогенные колебания, по мнению ряда авторов [16], обусловлены периодическими вазомоциями, порождающимися локальной пейсмекерной активностью внутри гладкомышечных волокон. Они отражают реактивность миоцитов и прекапиллярного звена микрогемоциркуляторного русла [16, 26]. Такой сдвиг спектральных характеристик в сторону активных компонентов обусловил процентное преобладание вклада эндотелиальных (33,89%) и нейрогенных колебаний (32,51%) в общую мощность спектра. Вклад миогенных колебаний (20,95%) среди активных механизмов регуляции микроциркуляции был наименьшим. Вклад высокочастотных составляющих спектра был значительно меньшим. Вклад дыхательных колебаний составил 8,25% и пульсовых колебаний – 4,15%.(см. табл. 2).

Таблица 2.

Спектральные характеристики основных ритмов у крыс с различными типами ЛДФ-грамм ($M \pm m$)

Спектральные характеристики	Типы ЛДФ-грамм	Апериодический (n=63)	Монотонный с низкой перфузией (n=34)	Монотонный с высокой перфузией (n=43)
			№ группы	1
Эндотелиальные колебания	Амплитуда перф.ед., Аэ	14,35±0,32	11,22±0,69 $p_{1,2} \leq 0,001$	15,46±0,07 $p_{1,3} \leq 0,05$ $p_{2,3} \leq 0,001$
	Вклад, %	33,89%	34,81%	27,61%
Нейрогенные колебания	Амплитуда, перф.ед., Ан	13,98±0,39	10,46±0,61 $p_{1,2} \leq 0,001$	15,87±0,58 $p_{1,3} \leq 0,01$ $p_{2,3} \leq 0,001$
	Вклад, %	32,51%	30,26%	29,09%
Миогенные колебания	Амплитуда перф.ед., Ам	11,23±0,45	8,75±0,53 $p_{1,2} \leq 0,001$	14,84±0,54 $p_{1,3} \leq 0,001$ $p_{2,3} \leq 0,001$
	Вклад, %	20,95%	21,17%	25,43%
Дыхательные колебания	Амплитуда, перф.ед., Ад	7,08±0,19	5,72±0,3 $p_{1,2} \leq 0,001$	9,81±0,35 $p_{1,3} \leq 0,01$ $p_{2,3} \leq 0,001$
	Вклад, %	8,25%	9,04%	11,11%
Пульсовые колебания	Амплитуда перф.ед., Ас	5,47±0,23	4,12±0,22 $p_{1,2} \leq 0,05$	7,64±0,35 $p_{1,3} \leq 0,01$ $p_{2,3} \leq 0,001$
	Вклад, %	4,15%	4,69%	6,74%

Примечание: p_{1-3} – достоверность отличий при сравнении значений показателей в группах 1-3 соответственно.

Такое соотношение вкладов основных ритмов для данного типа ЛДФ-грамм характерно и для человека [10]. Однако вклад высокочастотных компонентов спектра у крыс выше, а вклад низкочастотных ритмов в общую мощность спектра ниже, чем у человека.

Достаточно высокий уровень перфузии тканей, сочетанный с высокими амплитудами эндотелиальных, нейрогенных и миогенных ритмов на фоне сниженных значений амплитуд дыхательных и пульсовых колебаний свидетельствует об оптимальном кровенаполнении микроциркуляторного русла и своевременном оттоке со стороны венул. Это позволяет считать апериодический тип ЛДФ-грамм наиболее физиологически оптимальным и сбалансированным, что находит подтверждение в высоком относительно других групп значения ИЭМ $1,48 \pm 0,04$ (см. табл. 1).

При анализе тепловой пробы у животных с данным типом ЛДФ-грамм (рис. 3-А) наблюдался равномерный прирост и восстановление исходного уровня перфузии, а также пологое плато ЛДФ-граммы при максимальном нагреве, что свидетельствует о сбалансированности регуляторных процессов. Это подтверждается $T_{1/2}$ и РКК, имеющих средние значения относительно значений этих показателей в других группах (табл. 3). Сходные показатели и характер графика при тепловой пробе наблюдались в данном типе ЛДФ-грамм и у человека [9, 10]. Однако существует отличие показателей ПМ max-ПМ исх., что обусловлено исходно низким ПМ у крыс всех групп по отношению к показателю ПМ у человека.

Таблица 3.
Показатели микроциркуляции у крыс с разными типами ЛДФ-грамм при проведении тепловой пробы ($M \pm m$)

Тип ЛДФ-грамм	№ группы	M исх., перф. ед.	M max, перф. ед.	M max- M исх., перф. ед.	РКК, %	$T_{1/2}$, с
Апериодический	1	$4,06 \pm 0,13$	$6,67 \pm 0,16$	$2,61 \pm 0,13$	$164,34 \pm 3,26$	$123,58 \pm 1,26$
Монотонный с низкой перфузией	2	$3,04 \pm 0,12$ $p_{1,2} \leq 0,01$	$7,34 \pm 0,33$	$4,3 \pm 0,3$ $p_{1,2} \leq 0,001$	$238,66 \pm 10,84$ $p_{1,2} \leq 0,001$	$107,71 \pm 3,1$ $p_{1,2} \leq 0,05$
Монотонный с высокой перфузией	3	$6,23 \pm 0,28$ $p_{1,3} \leq 0,001$ $p_{2,3} \leq 0,001$	$7,48 \pm 0,2$	$1,25 \pm 0,12$ $p_{1,3} \leq 0,01$ $p_{2,3} \leq 0,001$	$120,09 \pm 1,82$ $p_{1,3} \leq 0,001$ $p_{2,3} \leq 0,001$	$155,68 \pm 2,89$ $p_{1,3} \leq 0,01$ $p_{2,3} \leq 0,001$

Примечание: p_{1-3} – достоверность отличий при сравнении значений показателей в группах 1-3 соответственно.

Таким образом, данные, полученные при анализе ЛДФ-грамм апериодического типа, показывают высокую степень сбалансированности регуляторных процессов у животных как в состоянии покоя, так и при функциональной нагрузке. Это обусловлено суперпозицией различных компонентов регуляции с доминированием низкочастотных ритмов, что соответствует физиологической норме [9, 17, 19] и позволяет отнести данный тип ЛДФ-грамм у крыс к нормоемическому типу микрогемодинамики.

Монотонный тип ЛДФ-грамм с низкой перфузией характеризовался наиболее низкими показателями базального кровотока ПМ ($3,04 \pm 0,12$ перф.ед.; $p \leq 0,001$), СКО ($0,42 \pm 0,02$ перф.ед.; $p \leq 0,001$) и Кв ($13,53 \pm 0,4\%$; $p \leq 0,01$) по сравнению с таковыми у животных апериодического типа ЛДФ-грамм (см. табл. 1, рис. 4).

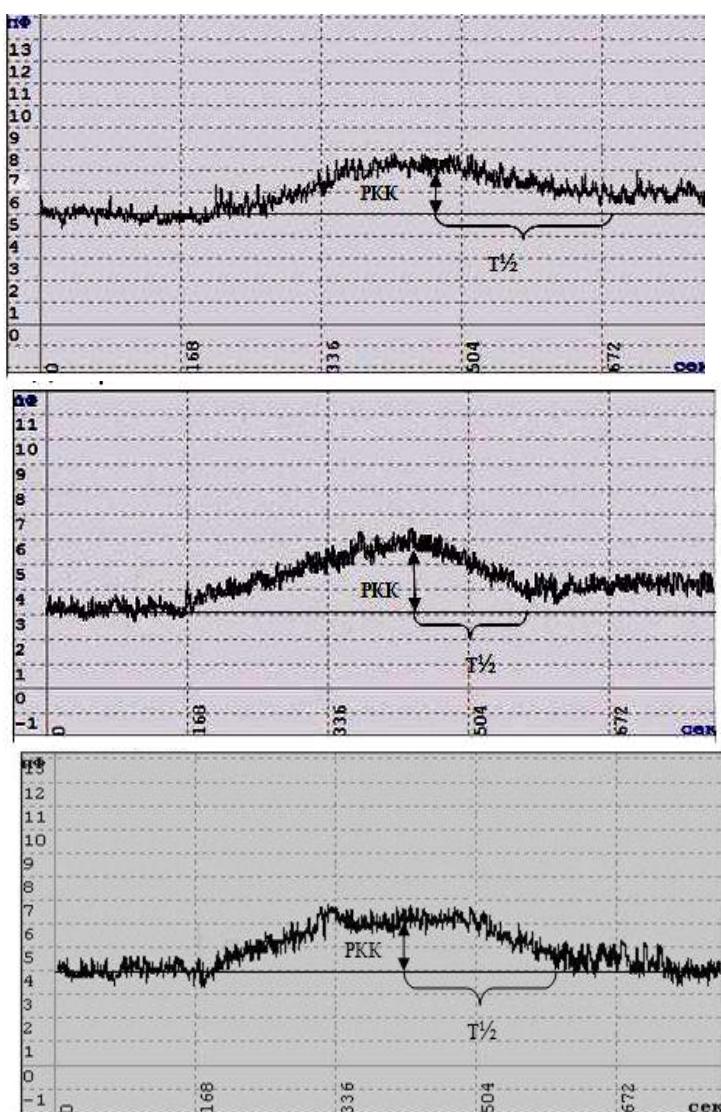


Рис. 3. Нативная запись ЛДФ-грамм при тепловой пробе:
 А – у крыс с апериодическим типом ЛДФ-грамм;
 Б – у крыс с монотонно низким типом ЛДФ-грамм;
 В – у крыс с монотонно высоким типом ЛДФ-грамм.

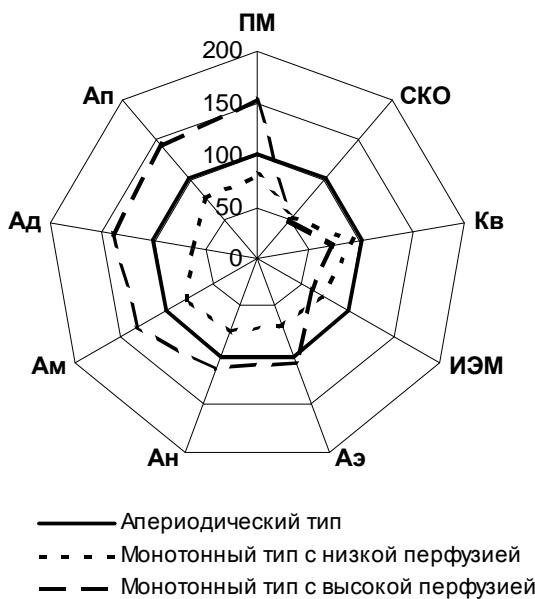


Рис. 4. Значения показателей микроциркуляции у крыс с монотонными типами ЛДФ-грамм (в % относительно значений у крыс с апериодическим типом, принятых за 100%).

Как и у крыс с апериодической ЛДФ-граммой, у животных данного типа отмечалось преобладание низкочастотных компонентов спектра над высокочастотными, однако зарегистрированы относительно низкие амплитуды нейрогенного компонента ($10,46 \pm 0,61$ перф.ед.; $p \leq 0,01$, вклад при этом составил 30,26%) (см. табл. 2), что позволяет сделать вывод о повышении симпатической адренергической активности. Это приводит к уменьшению лабильности сосудистой стенки, повышению ее жесткости и увеличению периферического сопротивления, что существенно ограничивает возможность кровенаполнения и объясняет невысокие показатели флакса [15-16]. Кроме того, достоверно сниженными были значения амплитуд дыхательных ($5,72 \pm 0,3$ перф.ед.; $p \leq 0,01$) и пульсовых волн ($4,12 \pm 0,22$ перф.ед.; $p \leq 0,05$), вклад которых в общую мощность спектра составил 9,04% и 4,69% соответственно (см. табл. 2), что свидетельствует о сниженнем притоке крови в микроциркуляторное русло за счет спазма приносящих сосудов [16, 22]. При сравнении с данными, полученными у человека [10], у крыс наблюдается существенно меньший вклад эндотелиальных колебаний и высокий вклад дыхательных и пульсовых колебаний в общий спектр флаксмоций.

Таким образом, можно сделать вывод, что данный тип микроциркуляции менее сбалансированный, чем апериодический. Это подтверждается и достоверно меньшим значением ИЭМ ($1,14 \pm 0,05$; $p \leq 0,05$) (см. табл. 1, рис. 4).

Для выявления реактивности микроциркуляции монотонного типа ЛДФ-грамм с низкой перфузией также были рассмотрены изменения параметров микроциркуляции при тепловой пробе. Оказалось, что у животных с исходно наиболее низким уровнем ПМ наблюдался наибольший РКК ($238,66 \pm 10,84\%$; $p \leq 0,001$) и наиболее быстрое восстановление исходных параметров перфузии, то есть самое низкое значение $T_{1/2}$, ($107,71 \pm 3,1$ с; $p \leq 0,05$) (см. табл. 3; рис.3-Б). Такая высокая реактивность системы микроциркуляции данного типа ЛДФ-грамм в сравнении с апериодическим типом обусловлена исходно более высоким нейрогенным тонусом [19], что отражается в низком значении показателя амплитуды нейрогенных колебаний (см. табл. 2, рис. 4).

Значения показателей РКК и $T_{1/2}$ при анализе тепловой пробы у крыс с монотонным типом ЛДФ-грамм и низкой перфузией близки к значениям таковых показателей у человека [9, 10, 12, 17] при исходно различном уровне перфузии. Это свидетельствует о сходных механизмах регуляции системы микроциркуляции и позволяет отнести этот тип ЛДФ-грамм к гипоемическому, или спастическому, типу микрогемодинамики.

Основными особенностями монотонного типа ЛДФ-грамм с высокой перфузией, в отличие от двух предыдущих, являлись достоверно более высокие значения ПМ ($6,2 \pm 0,28$ перф.ед.; $p \leq 0,001$) и низкие значения Кв ($8,54 \pm 0,59\%$; $p \leq 0,001$) и СКО ($0,53 \pm 0,01$ перф.ед.; $p \leq 0,001$) по сравнению с таковыми у животных 1 и 2 группы (см. табл. 1, рис. 4).

Это указывает на большую кровенаполняемость микрососудов на фоне относительно малой вариабельности флюктуаций микрокровотока, что отражается в монотонном характере ЛДФ-граммы. Также отличительной особенностью данного типа являются достоверно более высокие амплитудные значения всех компонентов спектра, нежели у животных предыдущих двух типов (см. табл. 2, рис. 4). Высокие амплитудные значения и вклады в общую мощность спектра миогенного (25,43%) и нейрогенного (29,09%) компонентов свидетельствуют о сниженных влияниях активных факторов регуляции микрокровотока, что влечет за собой компенсаторное увеличение вклада пассивных факторов в процесс регуляции за счет роста дыхательных (11,11%) и пульсовых (6,74%) колебаний [10, 16]. Следует отметить, что при анализе данного типа ЛДФ-грамм у человека [10] и крыс наблюдаются сходные в процентном отношении вклады эндотелиальных и миогенных компонентов спектра, наряду со сниженным вкладом нейрогенных колебаний и повышением вклада дыхательных и пульсовых колебаний у крыс.

Дыхательные волны в ЛДФ-грамме обусловлены периодическими колебаниями давления в венозном отделе микроциркуляторного русла, генерируемыми дыхательными экскурсиями грудной клетки [19]. Увеличение амплитуды дыхательной волны указывает на затрудненный отток из венул, что может привести к застойным явлениям в данном отделе микросудистого русла [12, 16]. Пульсовая волна связана с кардиоритмами и с током крови приходит в микроциркуляторное русло со стороны артерий. Амплитуда пульсовой волны зависит от смены систолического и диастолического давления, приводящее к изменению скорости движения эритроцитов в микрососудах [13, 19]. Следовательно, изменение

амплитуды пульсовой волны прямопропорционально изменению притока крови в системе микроциркуляции.

Наблюдаемое увеличение амплитуд дыхательных и пульсовых волн относительно значений данных показателей у других групп, наряду со сниженным влиянием вазомоторного компонента, свидетельствует о высоком притоке крови со стороны артериол, связанным с вазодилатацией и затрудненным оттоком крови со стороны венул, что приводит к гиперемии тканей у животных этой группы.

Угнетение вазомоторного механизма и смещение доминанты регуляции микрокровотока в высокочастотную область привело к снижению показателя ИЭМ ($0,87 \pm 0,03$), что достоверно меньше по сравнению с таковыми у животных первой ($p \leq 0,001$) и второй ($p \leq 0,05$) групп (см. табл. 1, рис. 4).

В тепловой пробе у крыс с монотонным типом ЛДФ-грамм и высокой перфузией наблюдалось уменьшение прироста перфузии (см. табл. 3, рис. 3-В) и РКК сравнительно значений этих показателей у животных других групп на фоне наиболее длительного $T_{1/2}$. Полученные данные согласуются с результатами анализа тепловой пробы у людей [9, 10].

Таким образом, данной группе животных свойственна наименьшая функциональная лабильность, что может объясняться низким нейрогенным тонусом и, соответственно, снижением уровня симпатического контроля и постоянным повышенным кровенаполнением тканей [9-10, 12, 19]. Это позволяет отнести данный тип ЛДФ-грамм к гиперемическому типу микрогемодинамики.

Следовательно, в результате анализа данных, полученных с помощью метода ЛДФ, у крыс выявлено три основных типа микрогемодинамики. Первый тип ЛДФ-грамм – апериодический (нормоемический) характеризуется наибольшей сбалансированностью активных и пассивных компонентов регуляции [19]. Подтверждением этого является дендрограмма кластерного анализа показателей микроциркуляции, построенная путем иерархического объединения их в кластеры более высокой общности на основе критерия минимума расстояния в пространстве переменных (рис. 5).

Дендрограмма показателей микроциркуляции у животных 1 группы с нормоемическим типом микроциркуляции состоит из трех кластеров (см. рис. 5-А).

Первый кластер объединяет компоненты активной регуляции микрокровотока (Аэ, Ан, Ам), что свидетельствует о тесной взаимосвязи эндотелиального, нейрогенного и миогенного компонентов.

Второй кластер включает компоненты пассивной регуляции (Ад, Ас) и показатели СКО, ИЭМ и ПМ. Следовательно, у животных с данным гемодинамическим типом величина СКО, ИЭМ и ПМ в значительной степени определяется влиянием дыхательных и пульсовых колебаний: чем меньше амплитудные значения дыхательных и пульсовых волн, тем выше ИЭМ [16]. Эти два кластера объединяются с третьим кластером, состоящим всего из одного компонента – Кв, однако длина этой связи максимальна, что определяет опосредованную связь этого показателя с остальными компонентами регуляции микрокровотока.

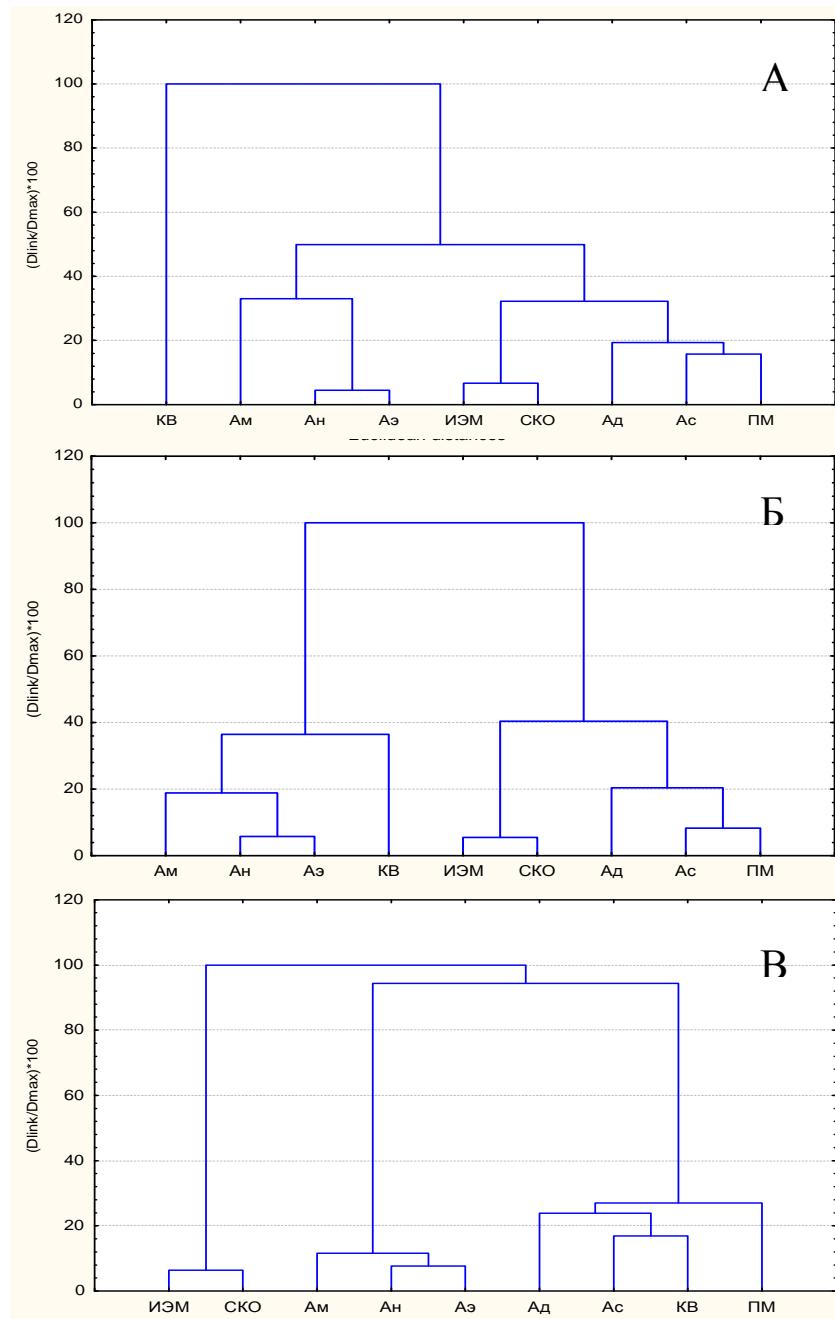


Рис. 5. Дендрограммы кластерного анализа показателей микроциркуляции у животных с разными микротипами (А – апериодический, Б – монотонный с низкой перфузией, В – монотонный с высокой перфузией).

Второй тип – монотонный с низкой перфузией (гипоемический), характеризуется повышенным нейрогенным тонусом на фоне сниженного влияния дыхательного компонента, что свидетельствует о преобладании симпатических влияний и некоторой констрикцией микрососудов. Увеличение жесткости сосудистой стенки обуславливает низкие показатели фрактала. Результатом является сниженный приток крови в микроциркуляторное русло, и, следовательно, низкий уровень перфузии. Данные механизмы отражаются в дендрограмме, состоящей из двух кластеров (см. рис. 5-Б). Характерным является объединение показателя Kv в один кластер с активными компонентами регуляции, что указывает на их тесную взаимосвязь, наряду с увеличением длины связи между Ad и Ac и показателями ИЭМ и СКО.

Третий тип – монотонный с высокой перфузией (гиперемический), отличается высоким показателем перфузии и монотонными колебаниями тканевого кровотока, обусловленными низкими показателями фрактала и Kv. При этом значительный вклад дыхательных и пульсовых компонентов, наряду со сниженным тонусом вазомоторных колебаний, свидетельствует об относительном ослаблении симпатических влияний и некоторой дилатации микрососудов, что приводит к повышенному притоку со стороны артериол и несколько затрудненному оттоку со стороны венул [14, 19]. Дендрограмма у испытуемых с данным микрогемодинамическим типом состоит из трех кластеров (см. рис. 5-В). Отличительной особенностью является объединение в один кластер показателей Kv и ПМ с пассивными факторами регуляции микрогемодинамики. А также выделение показателей ИЭМ и СКО в отдельный кластер и уменьшение их взаимосвязи с другими кластерами.

У крыс, как и у человека, методом ЛДФ выделено 3 типа микрогемодинамики: нормо-, гипо- и гиперемический, имеющие определенные отличия.

Нормоемический тип, численно доминирующий в исследуемой популяции животных, обладает наибольшей сбалансированностью регуляторных компонентов микроциркуляции: вазомоторного, метаболического и нейрогенного.

В случае исходно повышенного нейрогенного тонуса наблюдается констрикция и ригидность артериол, что приводит к снижению кровенаполнения микроциркуляторного русла и характерно для гипоемического типа.

Гиперемический тип микрогемодинамики характеризуется снижением вкладов вазомоторного и нейрогенного компонентов в общий спектр фрактально-сочетанных, что влечет за собой дилатацию прекапиллярного звена микроциркуляторного русла и повышение среднего уровня перфузии.

Таким образом, можно отметить схожесть механизмов регуляции микрогемодинамики у человека и крыс, однако для крыс характерен больший вклад высокочастотных ритмов в общий спектр фрактально-сочетанных.

ВЫВОДЫ

1. По совокупности ряда показателей ЛДФ-метрии у крыс выделено 3 типа ЛДФ-грамм: апериодический (44,53%), монотонные с низкой (31,25 %) и высокой перфузией (24,22 %).

ТИПОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ ЖИВОТНЫХ

2. Апериодический тип ЛДФ-грамм характеризуется высокими значениями флакса, коэффициента вариации, индекса эффективности микроциркуляции, доминированием в системе регуляции микрокровотока низкочастотных компонентов на фоне сниженного влияния высокочастотных волн, что указывает на полноценный приток крови в капиллярное русло и своевременный отток периферической крови и свидетельствует о высокой сбалансированности активных и пассивных составляющих регуляторных механизмов, что позволяет отнести данный тип ЛДФ-грамм к нормоемическому типу микрогемодинамики.
3. Монотонный тип ЛДФ-грамм с низкой перфузией достоверно отличается от апериодического типа более низкими значениями перфузии, флакса, коэффициента вариации, индекса эффективности микроциркуляции, амплитудами дыхательной волны, преобладанием симпатических нейрогенных влияний, что свидетельствует о слабом притоке крови в микроциркуляторное русло за счет спазма приносящих сосудов и меньшей, по сравнению с апериодическим типом, сбалансированностью низкоз- и высокочастотных компонентов регуляции. В пользу этого свидетельствуют и самые высокие из всех типов показатели реактивности в тепловой пробе, что делает возможным отнести этот тип ЛДФ-грамм к гипоемическому, или спастическому, типу микроциркуляции.
4. Монотонный тип ЛДФ-граммы с высокой перфузией характеризуется высокими значениями перфузии, низкими значениями флакса, коэффициента вариации и индекса эффективности микроциркуляции, высокими значениями амплитуд всех ритмов по сравнению с таковыми у двух предыдущих типов, что свидетельствует об угнетении вазомоторного механизма в регуляции микрокровотока, следствием чего является повышенный приток крови со стороны артериол и затрудненный отток со стороны венул. Это подтверждается низкой микрососудистой реактивностью в тепловой пробе на фоне наиболее высоких исходных значений перфузии, что позволяет отнести данный тип ЛДФ-грамм к гиперемическому типу микроциркуляции.
5. Методом ЛДФ-метрии выявлена схожесть механизмов регуляции микрогемодинамики у человека и крыс, однако для крыс характерен больший вклад высокочастотных ритмов в общий спектр флаксмоций.

Список литературы

1. Айрапетянц М.Г. Реакции на умеренные функциональные нагрузки у крыс с индивидуальными особенностями поведения / М.Г. Айрапетянц, Н.М. Хоничева, А.Я. Мехедова // Журн. выс. нерв. деят. -1980. - Т. 30, №5.- С. 994-1002.
2. Кириллина Т. Н. Особенности нейровегетативной регуляции у крыс с разной устойчивостью к стрессу, оцениваемые по вариабельности параметров гемодинамики / Т. Н. Кириллина, М. А. Усачева, Л. М. Белкина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2006. - Т. 142, № 10. - С. 376-381.
3. Лушников К.В. Влияние крайневысокочастотного электромагнитного излучения низкой интенсивности на показатели гуморального иммунитета здоровых мышей / К.В. Лушников, А.Б. Гапеев, В.Б. Садовников, Н.К. Чемерис // Биофизика. – 2001. – Т. 46, № 4. – С. 753-760.

4. Пшеникова М.Г. Различия поведения и устойчивости желудка к язвообразованию у крыс Август и Вистар при стрессе. / М.Г. Пшеникова, Н.А. Бондаренко, М.В. Шимкович., О.Н. Бондаренко, И.Ю. Малышев // Бюл. эксперим. биол. мед. 1999. - Т. 128. - № 12. - С. 638-641.
5. Темурьянц Н.А. Изменение некоторых психофизиологических функций под влиянием мм-терапии у лиц с различными индивидуальными особенностями организма / Н.А. Темурьянц, О.В. Хомякова, Е.Н. Чуян // Сб. докл. Крымского международного семинара «Космическая экология и ноосфера». – 1997. – С. 45.
6. Чуян Е.Н. Зависимость аналгетического действия низкоинтенсивного электромагнитного излучения крайне высокой частоты от индивидуальных особенностей животных / Е.Н. Чуян, Э.Р. Джелдубаева, И.В. Постольникова, Н.Н. Митрофанова // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И.Вернадского. Серия “Биология, химия”. – 2006. – Т. 19 (58), № 3. – С.27-35.
7. Штемберг А.С. Некоторые нейротропные эффекты электромагнитных волн малой интенсивности у крыс с разными типологическими особенностями высшей нервной деятельности / А.С. Штемберг, М.Г. Узбеков С.Н. Шихов // ЖВНД. – 2000. – Т. 50, № 5. – С. 867 – 877.
8. Calatayud F. Ethological validation and the assessment of anxiety-like behaviours: methodological comparison of classical analyses and structural approaches / F. Calatayud, C. Belzung, A. Aubert // Behav. Process. – 2004. - V. 67. – P. 195–206.
9. Станишевская Т.И. Индивидуально-типологические особенности микроциркуляции крови у девушек-студенток с разным соматотипом: диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук: 03.00.13 / Станишевская Татьяна Ивановна. – Мелитополь, Москва, 2006 г. – 174 с.
10. Чуян Е.Н.. Индивидуально-типологический подход к исследованию процессов микроциркуляции крови / Е.Н. Чуян, М.Н. Ананченко // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. - Серия «Биология. Химия». - 2009. - Т. 22 (61). – № 3. – С. 159-173.
11. Бабак О. Я. Артериальная гипертензия и ишемическая болезнь сердца – эндотелиальная дисфункция: современное состояние вопроса / О. Я. Бабак, Ю. Н. Шапошникова, В. Ю. Немцова // Укр. Терапевт. журн. - 2004. – №1. – С.14-21
12. Маколкин В.И. Метод лазерной допплеровской флюметрии в кардиологии / В.И. Маколкин, В.В. Бранько, С.А. Богданова. Пособие для врачей. – М.: Россельхозакадемия. – 1999. – 48 с.
13. Савельев В.С. Исследование микроциркуляции при хронической венозной недостаточности нижних конечностей. / В.С. Савельев. - М. – 2006. – 25 с.
14. Чернух А.М. Воспаление / А.М. Чернух. – М.: Медицина. – 1979. – 430 с.
15. Козлов В. И. Лазерная допплеровская флюметрия и анализ коллективных процессов в системе микроциркуляции / В. И. Козлов, Л.В. Корси, В.Г. Соколов // Физиология человека. –1998. – Т. 24., №6. – С. 112.
16. Крупаткин А.И. Лазерная допплеровская флюметрия микроциркуляции крови / А.И. Крупаткин, В.В. Сидоров. - М.: Медицина. – 2005. – 254 с.
17. Чуян Е.Н. Влияние низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ на процессы микроциркуляции / Е.Н. Чуян, Н.С. Трибрат // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. – 2008. – С. 167-175.
18. Глазная микроциркуляция у больных первичной глаукомой до и после операции / науч. ред. А.В. Муравьев. – Ярославль: Материалы международной конференции в микро- и макроциркуляции. Гемореология, 2005. – 149 с.
19. Козлов В. И. Система микроциркуляции крови: клинико-морфологические аспекты изучения / В. И. Козлов // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2006. - Т.5., N 1 - С.84-101.
20. Schmid – Schonbein H. Synergetic Interpretation of Patterned Vasomotor Activity in Microvascular Perfusion: Discrete Effects of Myogenic and Neurogenic Vasoconstriction as well as Arterial and Venous Pressure Fluctuations // H. Schmid – Schonbein, S. Ziege, R. Grebe, V. Blazek, R. Spielmann, F. Linzenich / Int J. Microcir. – 1997. – V.17. – P. 346-359.
21. Бакшинский П.П. Вейвлет-анализ общей и глазной микрогемодинамики у больных первичной открытоугольной глаукомой с нормализованным внутриглазным давлением / П.П. Бакшинский, А.Ю. Боголюбская, Г.А. Дроздова, Ф.Г. Сеидова, А.М. Шамшинова // Глаукома. –2006. – № 3. – С. 7.
22. Kvandal P. Regulation of human cutaneous circulation evaluated by laser Doppler flowmetry, iontophoresis, and spectral analysis: importance of nitric oxide and prostangladines / P. Kvandal, A. Stefanovska, M. Veber, H.D. Kvernmo, K.A. Kirkeboen // Microvascular Research. - 2003. – V.65. – P. 160-171.

23. Данченко Н.Н. Морфо-функциональное состояние микроциркуляции в стенке желудка и ее изменения при локальном тепловом и низкоинтенсивном лазерном воздействиях : диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук: 03.00.13 / Данченко Наталья Николаевна. –Москва, 2001 г. – 149 с.
24. Боровиков В.П. STATISTICA: искусство анализа данных на компьютере. Для профессионалов / В.П. Боровиков// СПб.: Питер. – 2001. – 656 с.
25. Савельев В.С. Исследование микроциркуляции при хронической венозной недостаточности нижних конечностей. Методическое пособие для врачей / В.С. Савельев // М. – 2006. – 25 с.
26. Stefanovska A. Physics of the human cardiovascular system / A. Stefanovska, M. Bracic // Contemporary Physics. – 1999. – V. 40, №1, p.31-35.

Чуян О.М. Індивідуально-типологічний підхід до дослідження процесів мікроциркуляції крові / О.М. Чуян, Н.А. Древетняк, О.Д. Богданова, М.Ю. Раваєва, Н.С. Трибрат // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2012. – Т. 25 (64), № 3. – С. 222-239.

Методом лазерної доплеровської флюметрії (ЛДФ) було виявлено індивідуально-типологічні особливості показників мікроциркуляції крові щурів. В результаті дослідження було виділено 3 типи ЛДФ-грамм: аперіодичний, монотонний з низькою і високою перфузією. Аналіз флаксмоцій мікрокровообігу та показників теплової проби показав, що найвищий ступінь збалансованості регуляторних процесів мікроциркуляції мають тварини з аперіодичним типом ЛДФ-грамм.

Ключові слова: мікроциркуляція крові, метод лазерної доплеровської флюметрії (ЛДФ), щури, теплова проба, аперіодичний тип, монотонний тип з низькою перфузією, монотонний тип з високою перфузією.

Chuyan E.N. Individually-tipological approach to research of processes of microblood circulation / E.N. Chuyan, N.A. Drevetnyak, O.D. Bogdanova, M.Y. Ravaeva, N.S. Tribrat // Scientific Notes of Taurida V. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No 3. – P. 222-239.

By a laser Doppler flowmetry (LDF) was studied individually-typological features of indicators of the blood microcirculation parameters in rats. There were 3 types LDF-grammes revealed as a result of research: aperiodic, monotonous with low and high perfusion. The analysis of the micro-blood flow fluxmotions and the parameters of the thermal probe showed the highest equation of the regulatory processes of the microcirculation in aperiodic type LDF-grammes.

Keywords: micro-blood circulation, a method of laser Doppler flowmetry (LDF), rats, thermal probe, aperiodic type, monotonous type with low perfusion, monotonous type with high perfusion.

Поступила в редакцию 22.09.2012 г.

Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского
Серия «Биология, химия». Том 25 (64). 2012. № 3. С. 240-255.

УДК. 516.12. - 008.318:613.614.2

**ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ СЕРДЕЧНОГО РИТМА ИСПЫТУЕМЫХ
В ВОССТАНОВИТЕЛЬНОМ ПЕРИОДЕ ПОСЛЕ ВЕЛОЭРГОМЕТРИЧЕСКОЙ
ПРОБЫ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО
ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ КРАЙНЕ ВЫСОКОЙ ЧАСТОТЫ**

Чуян Е.Н., Никифоров И.Р., Бирюкова Е. А.

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

Изучена вариабельность сердечного ритма в течение 30-минут восстановительного периода после субмаксимальной физической нагрузки у испытуемых с разным типом вегетативной регуляции при превентивном воздействии низкоинтенсивного электромагнитного излучения (ЭМИ) крайне высокой частоты (КВЧ).

Показано, что действие десятикратного ЭМИ КВЧ приводит к увеличению адаптивных возможностей организма, оптимизации регуляторных механизмов, снижению энергетических затрат и повышению скорости восстановительных процессов у испытуемых в ответ на субмаксимальную физическую нагрузку.

Ключевые слова: электромагнитное излучение крайне высокой частоты, вариабельность сердечного ритма, восстановительный период, велоэргометрическая проба.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что физическая нагрузка является идеальным и наиболее физиологичным видом провокации, позволяющим оценить полноценность компенсаторно-приспособительных механизмов организма [1, 2], поскольку характер протекания процессов восстановления физиологических функций после физических нагрузок является важнейшим критерием оценки функционального состояния испытуемых.

Ранее в наших исследованиях [3] показана возможность модулирования вариабельности сердечного ритма (ВСР) у испытуемых с разным типом вегетативной регуляции низкоинтенсивным электромагнитным излучением (ЭМИ) крайне высокой частоты (КВЧ), которое широко используется в медицинской практике для лечения различных заболеваний, в том числе сердечнососудистой системы (ССС) [4-6].

Однако эти данные могут быть существенно дополнены анализом изменения показателей ВСР в восстановительном периоде после физической нагрузки, в качестве которой эффективно использовать велоэргометрическое тестирование [8, 9].

В связи с этим, целью настоящей работы явилась оценка изменения показателей ВСР в течение 30-минутного восстановительного периода после субмаксимальной

физической нагрузки у испытуемых с разным типом вегетативной регуляции при превентивном воздействии низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании принимали участие 52 условно здоровых студента-волонтера женского пола в возрасте 18-21 года в межменструальном периоде. Все испытуемые дали добровольное согласие на участие в исследовании.

Предварительная запись ВСР выявила индивидуально-типологические отличия у испытуемых, связанные, в частности, со значениями индекса напряженности (ИН). Согласно классификации Р. М. Баевского [7], ИН отражает активность вегетативной нервной системы (ВНС), при этом испытуемых со средними значениями ИН ($50 \leq \text{ИН} \leq 200$ усл.ед.) относят к нормотоникам, с высокими значениями ($\text{ИН} \geq 200$ усл.ед.) – к симпатотоникам и низкими ($\text{ИН} \leq 50$ усл.ед.) – к ваготоникам. В эксперимент было отобрано равное количество волонтеров всех трех групп (всего 30 человек по 10 человек в каждой группе). Такой отбор позволил сформировать однородные группы испытуемых.

В первые сутки исследования у испытуемых проводили велоэргометрическую пробу (ВЭП) с помощью велоэргометра «KETTLER-X1» (производство «GmbH&Co postfach», Германия) в положении сидя с частотой вращения педалей 40-60 оборотов в минуту по методике ступенчато-возрастающей нагрузки (всего 3 ступени). Динамическая нагрузка продолжалась до достижения частоты сердечных сокращений (ЧСС) 75% от максимального возрастного уровня. Данный метод предложен К. Andersen и соавт. [8] и рекомендован к применению Комитетом экспертов ВОЗ. Продолжительность каждой ступени нагрузки составляла 3 мин, начальный уровень нагрузки (I-я ступень) – 75 Вт, II-я – 100 Вт и III-я – 125 Вт [9]. Критерием прекращения теста являлось достижение испытуемым субмаксимальной ЧСС (пробу заканчивали к моменту истечения текущей минуты) [10].

В последующие 10 дней эксперимента ежедневно в одно и то же время (с 10^{00} до 12^{00}) испытуемым проводили сеансы ЭМИ КВЧ с помощью 7-миканального аппарата «РАМЕД ЭКСПЕРТ-04» (производство научно-исследовательской лаборатории «Рамед», г. Днепропетровск; регистрационное свидетельство МЗ №783/99 от 14.07.99, выданное КНМТ МОЗ Украины о праве на применение в медицинской практике в Украине). Технические характеристики генератора: длина волны = 7,1 мм, частота излучения 42,4 ГГц, плотность потока мощности – 0,1 мВт/см². Воздействие осуществлялось в течение 30 минут на области биологически активных точек: GI-15 правого плечевого сустава, на симметричные E-34, RP-6 и GI-4. Выбор этих точек обусловлен их рефлексогенным общеукрепляющим и стимулирующим действием на организм испытуемых [11].

На 10-е сутки исследования после 10-тикратного ЭМИ КВЧ проводилась повторная ВЭП.

В качестве метода оценки влияния ЭМИ КВЧ и физической нагрузки на организм был использован математический анализ ВСР (в системе оценок, рекомендуемых стандартами Европейского Кардиологического Общества и Северо-Американского общества стимуляции и электрофизиологии [12]).

Запись ВСР осуществлялась путем регистрации ЭКГ сигнала в первом стандартном отведении с помощью программно-аппаратного комплекса «Омега-М» (производство научно-исследовательской лаборатории «Динамика», г. Санкт-Петербург) до и после ВЭП в 1-е и 10-е сутки исследования, а также ежедневно (с 9⁰⁰ до 11⁰⁰) на протяжении 10-ти дней сразу после воздействия ЭМИ КВЧ.

В работе были использованы показатели, являющиеся маркерами функционального состояния испытуемых и относящиеся к разным методам анализа ВСР: спектральные (HF, LF, TP и LF/HF; mc^2) и ИН (усл.ед; метод вариационной пульсометрии по Р. М. Баевскому [7]), которые подробно описаны в литературе и наших предыдущих исследованиях [12-16].

Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью пакета программ «Омега-М», «Статистика 6.0» и «Microsoft Excel». Достоверность различий полученных данных определяли с помощью критерия Вилкоксона.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изменение показателей ВСР испытуемых с разным типом вегетативной регуляции в восстановительном периоде после субмаксимальной физической нагрузки. В результате проведения записи ВСР до воздействия ЭМИ КВЧ были зарегистрированы достоверные различия как в ИН, так и в значениях спектральных показателей у испытуемых разных групп (табл.). Так, у испытуемых с наиболее низкими значениями ИН были зарегистрированы самые высокие значения спектральных показателей (HF, LF, TP), а коэффициент симпато-вагусного баланса (LF/HF) был максимально приближен к единице. У испытуемых-нормотоников, характеризующихся средними значениями ИН, амплитуды рассматриваемых ритмов были значительно ниже, чем у ваготоников, а значения LF/HF свидетельствовали о преобладании активности симпатической регуляции сердечного ритма (табл.). Минимальные значения спектральных показателей и аналогичное с нормотониками преобладание симпатической активности регистрировались у испытуемых симпатотоников, обладающих наиболее высокими значениями ИН. Полученные результаты согласуются с результатами, полученными в наших предыдущих работах [3, 16].

Проведение ВЭП привело к достоверным изменениям значений рассматриваемых показателей у испытуемых с разным типом вегетативной регуляции, заключающимся в повышении ИН и LF/HF и снижении HF, LF и TP (рис. 1).

Так, у испытуемых-ваготоников к 5-ой мин восстановительного периода после ВЭП было зарегистрировано повышение значений ИН на 150% ($p \leq 0,001$) и снижение HF, LF и TP на 44%, 36% и 45% ($p \leq 0,01$) соответственно по отношению к значениям этих показателей до ВЭП (см. рис.1). Кроме этого к 5-ой мин восстановительного периода было зарегистрировано повышение LF/HF на 32% ($p \leq 0,01$; составил 1,3), по отношению к значению до ВЭП.

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ СЕРДЕЧНОГО РИТМА ИСПЫТУЕМЫХ...

Следует отметить, что к 30-ой мин после ВЭП у испытуемых данной группы было зарегистрировано восстановление значений всех рассматриваемых показателей (см. рис. 1).

Таблица
Значения индекса напряженности и показателей спектрального анализа вариабельности сердечного ритма у испытуемых выделенных групп до и после 10-тикратного КВЧ-воздействия ($M \pm m$)

№ группы	1	2	3
до КВЧ-воздействия	Ваготоники (ИН≤50 усл. ед.)	Нормотоники (50≤ИН≤200 усл. ед.)	Симпатотоники (ИН≥200 усл. ед.)
	ИН $42,90 \pm 3,6$	$179,6 \pm 16,1$ $p_2 \leq 0,001$	$284,6 \pm 22,7$ $p_2 \leq 0,001$ $p_3 \leq 0,001$
	HF $1345,99 \pm 95,2$	$702,0 \pm 61,4$ $p_1 \leq 0,05$	$501,0 \pm 60,1$ $p_1 \leq 0,05$ $p_2 \leq 0,05$
	LF $1212,80 \pm 40,2$	$964,8 \pm 49,0$ $p_1 \leq 0,05$	$812,5 \pm 63,9$ $p_1 \leq 0,05$ $p_2 \leq 0,05$
	TP $3355,99 \pm 100,7$	$2236,0 \pm 153,6$ $p_1 \leq 0,05$	$1544,3 \pm 81,6$ $p_1 \leq 0,05$ $p_2 \leq 0,001$
	LF/HF $0,98 \pm 0,03$	$1,5 \pm 0,2$ $p_1 \leq 0,05$	$1,6 \pm 0,2$ $p_1 \leq 0,05$
после КВЧ-воздействия	ИН $40,90 \pm 3,6$ $p \geq 0,05$	$115,4 \pm 16,1$ $p \leq 0,05$ $p_2 \leq 0,001$ $p_3 \leq 0,05$	$161,3 \pm 18,7$ $p \leq 0,01$ $p_1 \leq 0,001$ $p_2 \leq 0,001$ $p_3 \leq 0,01$
	HF $1704,84 \pm 95,2$ $p \leq 0,05$ $p_3 \leq 0,01$	$992,4 \pm 39,4$ $p \leq 0,05$ $p_1 \leq 0,05$ $p_3 \leq 0,01$	$836,2 \pm 21,08$ $p_1 \leq 0,05$ $p_2 \leq 0,05$ $p_3 \leq 0,01$
	LF $1598,87 \pm 40,2$ $p \leq 0,05$ $p_3 \leq 0,01$	$1187,8 \pm 64,0$ $p \leq 0,05$ $p_1 \leq 0,05$ $p_3 \leq 0,05$	$1125,3 \pm 74,4$ $p \leq 0,05$ $p_1 \leq 0,05$ $p_2 \leq 0,05$ $p_3 \leq 0,001$
	TP $3601,51 \pm 100,7$ $p \leq 0,05$ $p_3 \leq 0,05$	$2611,5 \pm 115,9$ $p \leq 0,05$ $p_1 \leq 0,05$ $p_3 \leq 0,01$	$2064,3 \pm 97,6$ $p \leq 0,05$ $p_1 \leq 0,05$ $p_2 \leq 0,001$ $p_3 \leq 0,001$
	LF/HF $0,95 \pm 0,05$ $p \leq 0,05$	$1,1 \pm 0,1$ $p \leq 0,05$ $p_1 \leq 0,05$ $p_3 \leq 0,05$	$1,3 \pm 0,1$ $p \leq 0,05$ $p_1 \leq 0,05$ $p_3 \leq 0,05$

Примечание: p достоверность различий по критерию Манна-Уитни между значениями показателей до и после КВЧ-воздействия, $p_1 - p_3$ между значениями показателей в группах испытуемых, обозначенных в таблице 1 – 3.

Аналогичные изменения, выраженные, однако, в большей степени были зарегистрированы у испытуемых-нормотоников после ВЭП. Так, у испытуемых этой группы к 5-ой минуте восстановительного периода ИН увеличился на 509% ($p\leq 0,001$), значения HF, LF и TP снизились на 74%, 54% и 61% ($p\leq 0,001$) соответственно, а коэффициент LF/HF увеличился на 89% ($p\leq 0,001$; составил 2,8) по отношению к значениям данных показателей до ВЭП (см. рис. 1). Кроме этого, необходимо отметить, что у испытуемых-нормотоников ИН был на 918% ($p\leq 0,001$) выше, значения HF, LF и TP на 67% ($p\leq 0,01$), 42% ($p\leq 0,05$) и 51% ($p\leq 0,01$) соответственно ниже, а LF/HF на 139% ($p\leq 0,001$) выше, чем у испытуемых ваготоников к 5-ой мин восстановительного периода после ВЭП (рис. 2).

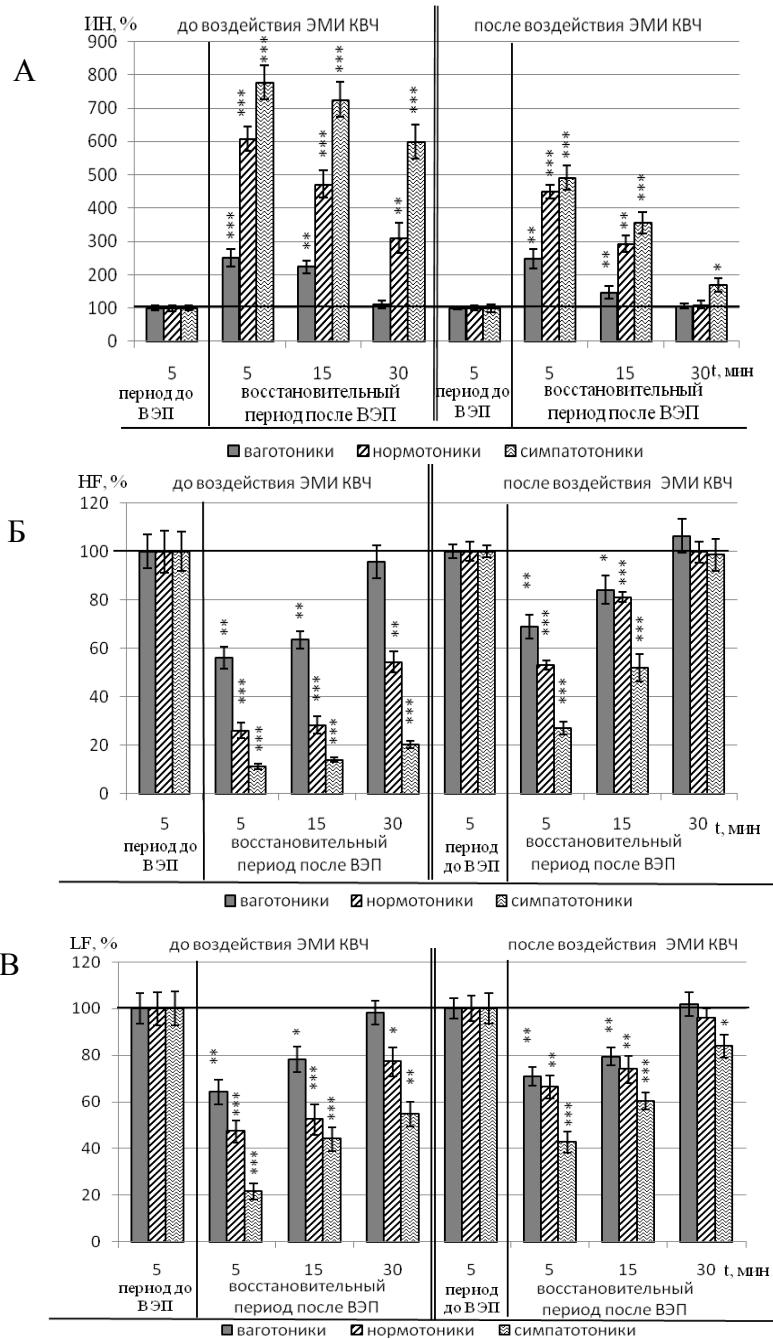
В дальнейшем у испытуемых этой группы наблюдали положительную динамику восстановления значений данных показателей, не достигающих, однако, исходного уровня (см. рис 1). Так, к 30-ой мин восстановительного периода ИН оставался на 210% ($p\leq 0,01$) выше, значения HF, LF и TP на 46% ($p\leq 0,01$), 23% ($p\leq 0,05$) и 29% ($p\leq 0,01$; см. рис. 1) соответственно ниже, а LF/HF на 35% ($p\leq 0,05$; составил 2,0) выше значений, полученных до ВЭП. Кроме этого у испытуемых данной группы ИН был на 1069% ($p\leq 0,001$) выше, значения HF, LF и TP на 71%, 38% и 28% ($p\leq 0,05$) соответственно ниже, а LF/HF на 82% ($p\leq 0,05$) выше значений, полученных у испытуемых-ваготоников к 30-ой мин восстановительного периода после ВЭП (см. рис. 2).

Следует отметить, что максимальные изменения значений изученных показателей после проведения нагрузочного тестирования были зарегистрированы у испытуемых-симпатотоников (см. рис. 1). Так, у этих испытуемых к 5-ой мин восстановительного периода ИН был на 677% ($p\leq 0,001$) выше, значения HF, LF и TP на 89%, 79% и 80% ($p\leq 0,001$; см. рис. 1) ниже значений, зарегистрированных до ВЭП. Вместе с тем, максимальное увеличение LF/HF (на 219% $p\leq 0,001$) по отношению к значениям, полученным до ВЭП, было зарегистрировано к 15-ой мин восстановительного периода, составив 5,2.

Кроме этого у испытуемых данной группы после проведения ВЭП были зарегистрированы наибольшие отличия значений ИН (на 1061%; $p\leq 0,001$ выше) и спектральных показателей (HF на 93%, $p\leq 0,01$; LF на 78%, $p\leq 0,001$; и TP на 82%, $p\leq 0,01$ ниже, а LF/HF на 150%, $p\leq 0,001$ выше) от значений данных показателей у испытуемых-ваготоников (см. рис. 2).

К 30-ой минуте восстановительного периода после ВЭП у симпатотоников регистрировались и максимальные различия значений рассматриваемых показателей по сравнению с таковыми, полученными до ВЭП. Так, значения ИН в эти сроки исследования были на 599% ($p\leq 0,001$) выше, HF, LF и TP – на 80% ($p\leq 0,001$), 46% ($p\leq 0,01$) и 59% ($p\leq 0,001$) соответственно ниже, а LF/HF на 171% ($p\leq 0,001$) выше значений, зарегистрированных до ВЭП (см. рис. 1).

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ СЕРДЕЧНОГО РИТМА ИСПЫТУЕМЫХ...



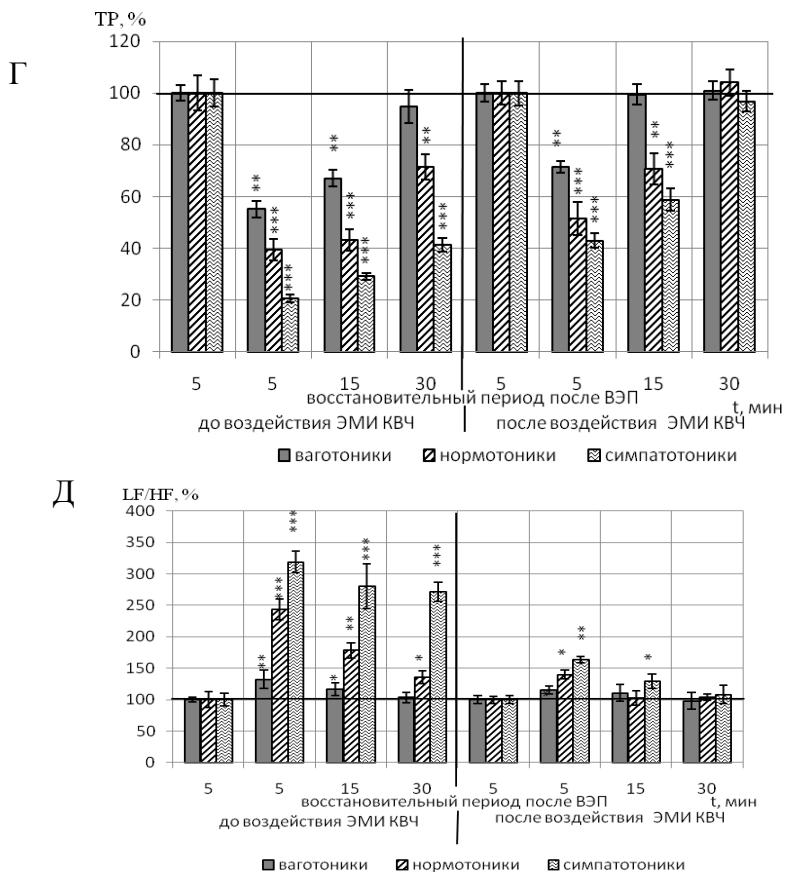


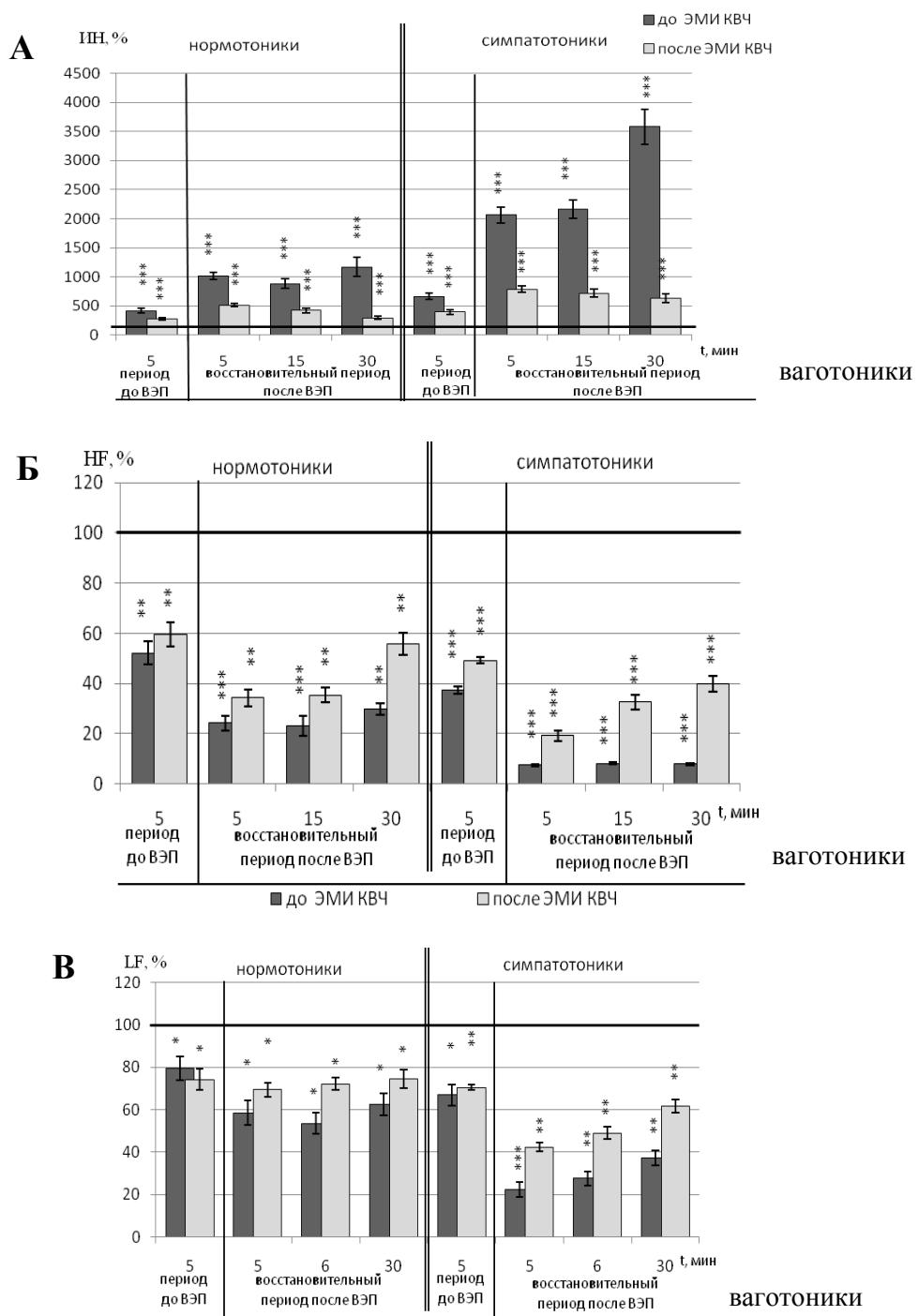
Рис. 1. Изменение значений индекса напряженности (А) и спектральных показателей сердечного ритма (Б – HF, В – LF, Г – TP, Д –LF/HF) в течение 30-ти мин восстановительного периода после ВЭП у испытуемых (в % по отношению к значениям до ВЭП, принятым за 100%) до и после 10-тикратного воздействия ЭМИ КВЧ

Примечания: * – достоверность различий относительно значений фоновой записи по критерию Вилкоксона: * – $p \leq 0,05$, ** – $p \leq 0,01$, *** – $p \leq 0,001$.

При этом отмечено, что у испытуемых этой группы на 30-ую минуту после ВЭП значения ИН и LF/HF были на 2581% и 300% соответственно выше, а значений HF, LF и TP на 92% ($p \leq 0,01$), 63% ($p \leq 0,01$) и 71% ($p \leq 0,05$), соответственно ниже, по отношению к значениям этих показателей у ваготоников (см. рис. 2).

Таким образом, у испытуемых-ваготоников были выделены минимальные изменения ВСР при проведении ВЭП, а отсутствие достоверных различий всех рассматриваемых показателей к 30 мин восстановительного периода после ВЭП с таковыми до нагрузочного тестирования свидетельствует о высокой эффективности восстановительных механизмов у испытуемых данной группы.

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ СЕРДЕЧНОГО РИТМА ИСПЫТУЕМЫХ...



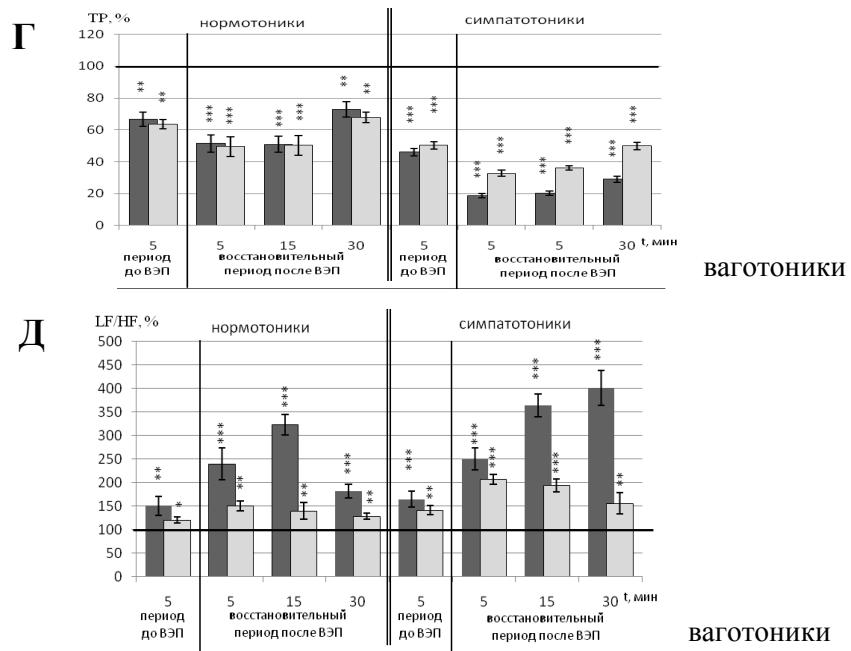


Рис. 2. Изменение значений индекса напряженности (А) и спектральных показателей вариабельности сердечного ритма (Б – HF, В – LF, Г – TP, Д – LF/HF) у испытуемых нормо- и симпатотоников (в % по отношению к значениям у испытуемых-ваготоников принятых за 100%) до и после 10-тикратного воздействия ЭМИ КВЧ.

Примечание: * – достоверность различий относительно значений фоновой записи по критерию Вилкоксона: * – $p \leq 0,05$, ** – $p \leq 0,01$, *** – $p \leq 0,001$.

Вместе с тем, у испытуемых нормо- и в особенности симпатотоников в восстановительный период после ВЭП было зарегистрировано увеличение ИН более чем в 5 – 6 раз, при этом известно, что ИН отражает уровень напряженности регуляторных систем организма [20]. Для сравнения заметим, что легкая физическая нагрузка сопровождается увеличением ИН в 1,5 – 2,0 раз [17], а эмоциональный предэкзаменацкий стресс в 1,1 – 3,9 раза [21], в 1,4 – 1,7 раза у космонавтов во время магнитной бури [22], в 20 – 30 раз у спортсменов, участвующих в соревнованиях по спортивным играм и в единоборствах, что свидетельствует о состоянии сильнейшего функционального напряжения, «на грани срыва адаптации» [23].

Таким образом, значительные увеличения ИН у испытуемых нормо- и симпатотоников к 5-ой мин восстановительного периода после ВЭП и сохранение высоких значений к 30-мин свидетельствует о высоком уровне напряжения регуляторных систем организма, и низкой эффективности восстановительных процессов, что может быть вызвано развитием стресс-реакции на физическую нагрузку у испытуемых данной группы.

Кроме того, к 5-ой мин восстановительного периода после ВЭП у испытуемых нормо- и симпатотоников произошли значительные снижения значений HF, LF и TP, что согласно [19, 24] свидетельствует о повышении активности центрального контура регуляции сердечным ритмом.

При этом известно, что HF-компоненты спектра отражают вагусный контроль сердечного ритма, LF-составляющая – состояние симпатического отдела ВНС [12] и, в частности, системы регуляции сосудистого тонуса, а TP характеризует активность вегетативных воздействий на СР и свидетельствует о текущем функциональном состоянии организма [15, 25].

Таким образом, значительное снижение показателей спектрального анализа свидетельствует об ухудшении функционального состояния и усилении активности центрального контура регуляции СР у испытуемых. При этом к 5-ой мин восстановительного периода после ВЭП у испытуемых нормо- и симпатотоников регистрировалось чрезмерное увеличение коэффициента LF/HF (отображающего относительную активность симпатоадреналовой системы (САС) организма [19]) и сохранение его высоких значений в течение последующих 30-ти минут. Следовательно, зарегистрированное увеличение LF/HF после ВЭП у испытуемых данных групп свидетельствует о значительном повышении активности САС после физической нагрузки.

Таким образом, увеличение напряжения регуляторных систем организма (ИН), активности центрального контура регуляции СР (HF, LF), ухудшение функционального состояния организма (TP) на фоне увеличения активности САС (LF/HF), одной из основных стресс-реализующих систем организма, согласно [19, 20, 26] свидетельствуют о развитии стресс-реакции на ВЭП.

Изменение ВСР после ВЭП у испытуемых после превентивного воздействия ЭМИ КВЧ. Десятикратное воздействие ЭМИ КВЧ привело к изменению ВСР испытуемых выделенных групп. При этом у испытуемых-ваготоников изменения касались только значений спектральных показателей (увеличение HF на 26%, LF на 31% и TP на 7%; $p \leq 0,05$), а ИН не имел достоверных различий по сравнению со значениями до КВЧ-воздействия (табл.). У испытуемых-нормотоников регистрировались снижение ИН (на 36%, $p \leq 0,05$), и увеличении HF на 41%, LF на 23% и TP на 16% ($p \leq 0,05$) относительно значений до КВЧ-воздействия (табл.). Максимальные снижение ИН (на 44%, $p \leq 0,01$) и увеличение спектральных показателей (HF на 67%, LF на 38% и TP на 33%; $p \leq 0,05$) по отношению к значениям этих показателей до КВЧ-воздействия наблюдались у испытуемых с симпатотоническим типом вегетативной регуляции (табл.). Полученные данные согласуются с результатами наших предыдущих исследований [27].

Превентивное воздействие ЭМИ КВЧ привело к изменению ВСР после ВЭП.

Так, у испытуемых-ваготоников к 5-ой мин восстановительного периода после ВЭП на 10-е сутки исследования значения HF, LF и TP были на 55%, 45% и 39% ($p \leq 0,05$) соответственно выше, LF/HF на 18% ($p \leq 0,05$) ниже, а ИН не имел достоверных различий ($p \geq 0,05$) по отношению к значениям данных показателей,

полученных после проведения ВЭП до КВЧ-воздействия. При этом максимальные различия значений ИН (на 38%, $p \leq 0,05$ ниже), HF (на 67%, $p \leq 0,01$ выше) и TP (на 59%, $p \leq 0,01$ выше) были зарегистрированы к 15-ой мин, а значений LF (на 47%, $p \leq 0,05$ выше) и LF/HF (19% $p \leq 0,05$ ниже) к 10-ой мин восстановительного периода после ВЭП, по отношению к значениям этих показателей в те же сроки восстановительного периода до КВЧ-воздействия. Вместе с тем, было зарегистрировано восстановление всех рассматриваемых показателей в более ранние сроки после ВЭП. Так, к 20-ой мин восстановительного периода было зарегистрировано полное восстановление значений ИН и HF, а значений LF, TP и LF/HF не имели достоверных различий ($p \geq 0,05$) к 25-ой, 15-ой и 10-ой мин соответственно по сравнению со значениями, полученными до ВЭП (см. рис.1).

Аналогичные изменения, выраженные, однако, в большей степени были зарегистрированы у испытуемых-нормотоников (см. рис. 1).

Так, к 5-ой мин восстановительного периода после ВЭП на 10-е сутки исследования значения ИН были на 53% ($p \leq 0,05$) ниже, значения HF, LF и TP на 192% ($p \leq 0,01$), 72% и 52% ($p \leq 0,05$) соответственно выше, а LF/HF на 43% ($p \leq 0,05$) ниже значений этих показателей после ВЭП до КВЧ-воздействия (см. рис.1). При этом к 15-ой мин восстановительного периода после КВЧ-воздействия были зарегистрированы наибольшие изменения значений как ИН (на 61%, $p \leq 0,01$ ниже), так и спектральных показателей (HF на 314%, $p \leq 0,001$; LF на 74% и TP на 91%, $p \leq 0,05$ выше, а LF/HF на 45%, $p \leq 0,05$ ниже) относительно значений после ВЭП до КВЧ воздействия (см. рис. 1).

Кроме того, у испытуемых-нормотоников также зарегистрировано восстановление всех рассматриваемых показателей в более ранние сроки восстановительного периода по сравнению с 1-ми сутками наблюдения. Так, к 25-ой мин восстановительного периода после ВЭП было зарегистрировано полное восстановление значений ИН и TP, а восстановления значений HF, LF и LF/HF регистрировались к 20-ой, 30-ой и 15-ой мин восстановительного периода, до уровня значений этих показателей до ВЭП (см. рис. 1).

Следует отметить, что с 5-ой по 30-ю минуту восстановительного периода произошло уменьшение различий как ИН (с 413% до 195%; $p \leq 0,001$) так и значений HF (с 67%; $p \leq 0,01$ до 45%; $p \leq 0,05$), LF (с 31% до 26%; $p \leq 0,05$), TP (с 51%; $p \leq 0,01$ до 33%; $p \leq 0,05$) и LF/HF (с 50%; $p \leq 0,001$ до 28%; $p \leq 0,05$) по отношению к значениям, полученным в те же минуты у испытуемых-ваготоников (см. рис. 2).

Максимальные изменения реакции изученных показателей на ВЭП после 10-тикратного КВЧ-воздействия были зарегистрированы у испытуемых симпатотоников (см. рис 1). Так, к 5-ой мин восстановительного периода после ВЭП на 10-е сутки исследования значения ИН были на 65% ($p \leq 0,05$) ниже, значения HF, LF и TP – на 299%, 175% и 177% ($p \leq 0,05$; рис. 4) выше, а LF/HF на 25% ($p \leq 0,05$) ниже значений данных показателей, полученных после ВЭП до проведения КВЧ-воздействия. При этом к 30-ой мин регистрировалось наибольшее отличие как ИН (были на 85%, $p \leq 0,001$ ниже), так и значений спектральных показателей (были HF на 600%, $p \leq 0,001$; LF на 294% и TP на 213%, $p \leq 0,05$ выше, а LF/HF на 67%, $p \leq 0,05$ ниже), по отношению к значениям после ВЭП до воздействия ЭМИ КВЧ. Кроме

этого, после КВЧ-воздействия было зарегистрировано полное восстановление значений HF, TP и LF/HF к 30-ой мин после ВЭП.

Вместе с тем, у испытуемых-симпатотоников с 5-ой по 30-ю мин регистрировалось уменьшение различий в значениях как ИН (с 685% до 532%; $p \leq 0,001$) так и спектральных показателей HF (с 81% до 61%; $p \leq 0,01$) LF (с 58% до 39%; $p \leq 0,01$) TP (с 68%; $p \leq 0,01$, до 53%; $p \leq 0,05$) и LF/HF (с 106% до 56% $p \leq 0,001$) по отношению к значениям, полученным в те же минуты у испытуемых-ваготоников.

Таким образом, в результате превентивного КВЧ-воздействия у испытуемых всех трех групп ответная реакция ВСР на физическую нагрузку была менее выраженной (см. рис. 1). При этом увеличение ИН в два – четыре раза (см. рис. 1) у испытуемых всех групп после ВЭП на фоне 10-тидневного КВЧ-воздействия является адекватной ответной реакцией на субмаксимальную физическую нагрузку [20, 28].

Кроме этого превентивное 10-тикратное КВЧ-воздействие привело к менее выраженному снижению спектральных показателей (HF, LF и TP) (см. рис.1) в ответ на ВЭП, значения которых оставались в пределах нормы или незначительно выходили за ее границы, что свидетельствует об увеличении вагусных воздействий и оптимизации барорефлекторной регуляции, а, следовательно, и большей активации вегетативного контура регуляции СР по сравнению с данными, полученными до воздействия ЭМИ КВЧ.

Также следует обратить внимание на то, что увеличение коэффициента LF/HF к 5-ой мин восстановительного периода после ВЭП на фоне КВЧ-воздействия не выходило за пределы нормы, что, согласно исследованиям В.М. Михайлова свидетельствует о незначительном увеличении активности САС и отсутствии развития стресс-реакции у испытуемых всех трех групп.

Кроме того, после КВЧ-воздействия восстановление изученных показателей после физической нагрузки происходило в более ранние сроки, по сравнению с данными, полученными до воздействия ЭМИ КВЧ, что свидетельствует о повышении эффективности восстановительных механизмов, под влиянием этого физического фактора.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об оптимизации функционального состояния испытуемых с разными типами вегетативной регуляции, увеличении адаптивных возможностей организма к физической нагрузке, увеличении скорости адаптивных процессов. Однако в большей степени восстановление изученных показателей ВСР происходило у испытуемых, исходно характеризующихся симпатическим типом вегетативной регуляции.

Кроме этого на протяжении восстановительного периода было зарегистрировано приближение значений рассматриваемых показателей у испытуемых симпато- и нормотоников к значениям испытуемых-ваготоников (см. рис.2), что можно объяснить действием закона «начальных значений» Вильдера-Лейтеса, основной смысл которого состоит в «стягивании исходно различных значений показателя к единому уровню. Этап реакции, состоящий в уменьшении

дисперсии признака, формируется чаще в зоне средних значений физиологической нормы» [29].

Такие изменения у испытуемых под влиянием ЭМИ КВЧ согласуются как с нашими [30, 31], так и с литературными данными [32, 33], свидетельствующими о том, что эффекты, получаемые от действия ЭМИ КВЧ на организм человека и животных, зависят от исходного функционального состояния испытуемых.

Таким образом, превентивное 10-кратное воздействие ЭМИ КВЧ имеет выраженное антистрессорное действие, которое проявляется в повышении резистентности организма к физической нагрузке и эффективности восстановительных механизмов. При этом выраженность эффектов ЭМИ КВЧ зависит от типа вегетативной регуляции испытуемых.

ВЫВОДЫ

1. Превентивное 10-кратное воздействие ЭМИ КВЧ имеет выраженное антистрессорное действие, которое проявляется в повышении резистентности организма к физической нагрузке и эффективности восстановительных механизмов. При этом выраженность эффектов ЭМИ КВЧ зависит от типа вегетативной регуляции испытуемых.
2. В результате курсового КВЧ-воздействия к 5-ой минуте восстановительного периода у испытуемых-ваготоников наблюдались наименее выраженные изменения спектральных показателей (HF, LF и TP были на 55%, 45% и 39% выше, а LF/HF на 18% ниже) и отсутствие различий индекса напряженности по отношению к значениям этих показателей до КВЧ-воздействия, что связано с наиболее высокими значениями спектральных показателей и низкими значениями индекса напряженности до физической нагрузки. При этом восстановление значений данных показателей после нагрузки происходило на 15 – 20 минут раньше, чем до КВЧ-воздействия.
3. У испытуемых-нормотоников под превентивного 10-тикратного ЭМИ КВЧ к 5-ой минуте восстановительного периода наблюдались более выраженные изменения спектральных показателей (HF, LF и TP на 192%, 72% и 52% соответственно выше, а LF/HF на 43% ниже) и индекса напряженности (на 53% ниже) по отношению к значениям этих показателей до КВЧ-воздействия. При этом восстановление значений данных показателей после нагрузки происходило на 5 – 10 минут раньше, чем до КВЧ-воздействия.
4. У испытуемых-симпатотоников в результате превентивного 10-тикратного воздействия ЭМИ КВЧ к 5-ой минуте восстановительного периода происходили максимальные изменения спектральных показателей (HF, LF и TP на 299%, 175% и 177% соответственно выше, а LF/HF на 25% ниже) и индекса напряженности (на 65% ниже) по отношению к значениям этих показателей до КВЧ-воздействия, что связано с изначально наибольшим отклонением значений изученных показателей от нормы. При этом к 30-ой минуте регистрировалось наибольшее отличие как индекса напряженности (на 85% ниже), так и значений спектральных показателей (HF на 600%, LF на 294% и TP

- на 213% выше, а LF/HF на 67% ниже), по отношению к значениям после ВЭП до воздействия ЭМИ КВЧ.
5. Превентивное 10-тикратное воздействие ЭМИ КВЧ привело к уменьшению межгрупповых различий у испытуемых с разным типом вегетативной регуляции, как в состоянии покоя, так после велоэргометрической пробы.
 6. Превентивное 10-тикратное воздействие низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ обладает антистрессорным действием на субмаксимальную физическую нагрузку у испытуемых с разным типом вегетативной реакции.

Список литературы

1. Аронов Д.М. Функциональные пробы в кардиологии / Д.М. Аронов, В.П. Лупанов. – Изд. 2-е – М., 2003. – 296 с.
2. Braunwald's heart disease: a textbook of cardiovascular medicine / D.P. Zipes [et al.] – 7-th ed. – Philadelphia, 2005, p. 107-136.
3. Особенности вариабельности сердечного ритма у испытуемых с разным типом вегетативной регуляции при воздействии низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ / [Е.Н. Чуян, И.Р. Никифоров, Е.А. Бирюкова и др.] – Ученые записки Таврического национального университета, сер. «Биология. Химия». – 2011. – Т. 24 (63), № 4, – С. 280-289.
4. Крайневысокочастотная терапия в медицине / [А.А. Соломаха, Д.А. Соломаха, В.В Якунин и др.] – Вестник службы крови России. – 2009. – № 3 – 34-36 с.
5. Бецкий О.В. Применение низкоинтенсивных миллиметровых волн в биологии и медицине / О.В. Бецкий, Н.Н.Лебедева // Биомедицинская радиоэлектроника – 2007. – № 8. – С. 6-15.
6. Головачева Т.В. Некоторые патогенетические аспекты применения ЭМИ ММД у больных стенокардией / Т.В. Головачева, В.Ф. Кирчук, В.Ф. Петрова – Применение низкоинтенсивных лазеров и излучения миллиметрового диапазона в эксперименте и клинике. – Саратов, 1994. – С. 210-213.
7. Баевский Р.М. Оценка функционального состояния организма на основе математического анализа сердечного ритма: метод. рек. / Р. М. Баевский, Ж. Ю. Барсукова. – Владивосток: ДЦО АН СССР, 1989. – 40 с.
8. Fundamentals of exercise testing / [K. Andersen, R. Shephard, H. Denolin H. et al.]. – Geneva, 1979. – 320 р.
9. Аронов Д.М. Функциональные пробы с физической нагрузкой / Под ред. Е.И. Чазова – Болезни сердца и сосудов: руководство для врачей: Т. 1 / – М., 1992. – С. 292-311.
10. Проведение пробы с физической нагрузкой с использованием пакета программ «КардиоКит»: метод. рекомендации. – СПб: Биосигнал, 2003. – 24 с.
11. Мачерет Б.Л. Руководство по рефлексотерапии / Е.Л. Мачерет, И.З. Самосюк – К.: Вища шк., 1984. – 304 с.
12. Вариабельность сердечного ритма: стандарты измерения, физиологической интерпретации и клинического использования / Рабочая группа Европейского кардиологич. об-ва и Северо-Американского об-ва стимуляции и электрофизиологии // Вестник Аритмол. – 1999. – №11. – 53-78 с.
13. Heart rate dynamics during human sleep / [Cajochen C., Pischke J., Aeschbach D. et al] – Physiol. Behav. – 1994. – V. 55, № 4.– P. 769.
14. Баевский Р.М. Оценка адаптационных возможностей организма и риск развития заболеваний / Р.М. Баевский, А.П. Берсенева. – М.: Медицина, 1997. – 236 с.
15. Михайлов В.М. Вариабельность сердечного ритма: опыт практического применения / В.М. Михайлов – Иваново: Нейрософт, 2000. – 200 с.
16. Индивидуальный профиль функционального состояния организма студентов с различным типом вегетативной регуляции / [Е.Н. Чуян, Е.А. Бирюкова, М.Ю. Раваева] – Ученые записки Таврического национального университета, сер. «Биология, химия». – 2009. – Т. 22 (61), №2. – С.152 – 165

17. Анализ вариабельности сердечного ритма при использовании различных электрокардиографических систем: метод. рек. / Р. М. Баевский, Г. Г. Иванов, Л. В. Чирейкин [и др.] // Вестник аритмологии. – 2001. – № 24. – С. 1-23.
18. Покровский В.М. Формирование ритма сердца в организме человека и животных / В. М. Покровский. – Краснодар, 2007. – С. 63–71.
19. Михайлов В.М. Вариабельность ритма сердца: опыт практического применения. / В.М. Михайлов / Иваново: Иван. гос. мед. академия, 2002. – 290 с.
20. Баевский Р.М., Математический анализ сердечного ритма при стрессе / Р.М. Баевский, О.И. Кирилов / . – М.: Наука, 1984. – 220 с.
21. Щербатых Ю.В. Вегетативные проявления экзаменационного стресса: автореферат дис.... д-ра биол. наук. – СПб., 2001. – 12 с.
22. Григорьев А.И. Концепция здоровья и проблема нормы в космической медицине / А.И. Григорьев Р.М. Баевский / – М.: Ф-ма «Слово», 2001. – 96 с.
23. Агаджанян Н.А. Соревновательный стресс у представителей различных видов спорта по показателям вариабельности сердечного ритма / Н.А. Агаджанян, Т.Е. Батоцыренова, Ю.Н. Семенов / Теория и практика физической культуры. – 2006. – №1. 2-4 с.
24. Применение спектрального анализа вариабельности сердечного ритма для повышения диагностической значимости нагрузочных проб / Гриднев В. И., Киселев А. Р., Посненкова О.М. [и др.] // Вестник Санкт-Петербургского университета, Сер. 11 – 2008. – Вып. 2.– С. 435
25. Баевский Р. М. Анализ вариабельности сердечного ритма: история и философия, теория и практика / Р. М. Баевский / Клин. информат. И Телемед. – 2004. – №1. 54 -64 с.
26. Похачевский А.Л. Функциональное состояние и адаптационные резервы организма / А.Л. Похачевский, В.М. Михайлов, А.А. Груздев, А.В. Садков / Вестник новг. гос. Университета, 2006. – № 35., 11-15 р.
27. Особенности вариабельности сердечного ритма у испытуемых с разным типом вегетативной регуляции при воздействии низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ / [Е.Н. Чуян, И.Р. Никифоров, Е.А. Бирюкова и др.] – Ученые записки Таврического национального университета, сер. «Биология. Химия». – 2011. – Т. 24 (63), № 4, – С. 280-289.
28. Соревновательный стресс у представителей различных видов спорта по показателям вариабельности сердечного ритма / Н. А. Агаджанян, Т. Е. Батоцыренова, Ю. Н. Семенов [и др.] // Теория и практика физической культуры. – 2006. – № 1. – С. 2-4.
29. Плеханов Г.Ф. Зависимость реакции биосистемы на раздражитель от ее исходного значения / Г.Ф. Плеханов, Н.В. Васильев, Т.И. Козлова // Бюл. Сиб. отд. АМН СССР. – 1989. – № 2. – С. 83-86.
30. Чуян Е.Н. Вариабельность сердечного ритма после физической нагрузки в условиях превентивного воздействия низкоинтенсивного электромагнитного излучения крайне высокой частоты / Е.Н.Чуян, И.Р. Никифоров // Ученые записки Таврического национального университета, сер. «Биология, химия». – 2011. – Т. 24(63), №2. – С. 321-331.
31. Чуян Е.Н. Нейроиммunoэндокринные механизмы адаптации к действию низкоинтенсивного электромагнитного излучения крайне высокой частоты: дис доктора биологических наук: Е. Н. Чуян – Д. 004. – 417с.
32. Бецкий О.В. Применение низкоинтенсивных миллиметровых волн в медицине (ретроспективный обзор) / О.В.Бецкий, Н.Н. Лебедева, Т.И. Котовская – Миллиметровые волны в биологии и медицине – 2005. –№2 (38) г. – С. 23-39.
33. Локшина О.Д Состояние гемодинамики и изменения сократительной функции миокарда у больных стенокардией в процессе лечения КВЧ / О.Д. Локшина, Т.Б. Реброва – Сб.: Миллиметровые волны в медицине и биологии. - М. - 1989. - С. 41-42.

Чуян О.М. Варіабельність серцевого ритму випробуваних у відновному періоді після велоергометричної проби під дією низькоінтенсивного електромагнітного випромінювання над високою частоти / О.М. Чуян, І.Р. Нікіфоров, О.О. Бірюкова // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2012. – Т. 25 (64), № 3. – С. 240-255.

Вивчена варіабельність серцевого ритму протягом 30-хвилин відновного періоду після субмаксимального фізичного навантаження у випробуваних з різним типом вегетативної регуляції під впливом керованого електромагнітного випромінювання (ЕМВ) надвисокої частоти (НВЧ).

Показано, що десятиденне ЕМВ НВЧ призводить до збільшення адаптивних можливостей організму, оптимізації регуляторних механізмів, зниження енергетичних витрат і підвищення швидкості відновних процесів у випробуваних у відповідь на субмаксимальне фізичне навантаження.

Ключові слова: електромагнітне випромінювання надвисокої частоти, варіабельність серцевого ритму, відновний період, велоергометрічна проба.

Chujan E.N. Heart rate variability at examinees in regenerative period after bicycle ergometric test under the electromagnetic radiation extremely high frequency / E.N. Chujan, I.R. Nikiforov, E.A. Birukova // Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No 3. – P. 240-255.

Heart rate variability within 30-minutes regenerative period after the electromagnetic radiation (EMR), extremely high frequency (EHF) influence..

It is shown that ten-day EMR EHF to increase in adaptive capability of an organism, optimization of regulating mechanisms, decreasing in power expenses and increasing of regenerative speed processes at examinees in answer to the submaximum physical activity.

Keywords: electromagnetic radiation, extremely high frequency, heart rate variability, the regenerative period, bicycle ergometric test.

Поступила в редакцію 22.09.2012 г.

Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского
Серия «Биология, химия». Том 25 (64). 2012. № 3. С. 256-266.

УДК 612.14/16:633.8:582.475

ВЛИЯНИЕ ЭФИРНОГО МАСЛА КЕДРА НА СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТУЮ СИСТЕМУ ЧЕЛОВЕКА

Янцев А.В, Кириллова А.В., Панова С.А., Майданская О.Д.

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

Установлено статистически достоверное гипотензивное действие паров кедрового масла. Было отмечено снижение как систолического так и диастолического давления. Выявлено также статистически достоверное снижение частоты сердечных сокращений при проведении процедур ароматерапии.

Ключевые слова: ароматерапия, эфирное масло, артериальное давление, частота сердечных сокращений.

ВВЕДЕНИЕ

Ароматерапия — один из самых древних методов лечения, действующим фактором являются летучие компоненты эфирных масел растений [1]. Этот метод лечения официально применяется в практическом здравоохранении, однако относится к нетрадиционной медицине. Терапевтический эффектом эфирных масел обусловлен не только действием уникальных химических компонентов на тканевом, клеточном, субклеточном уровнях, но и с восприятием их запаха [2].

Распознавание запаха возникает при одновременном возбуждении приблизительно 40 рецепторов, причем эта способность очень индивидуальна. Запах обусловлен размером и формой молекулы и ее соответствием с обонятельной лункой. Постепенно ощущение запаха проходит, но молекулы еще продолжают действовать. Запахи эфирных масел через обонятельные рецепторы воздействуют на гипоталамо-гипофизарную систему, стимулируя высвобождение медиаторов и оказывая действия на психоэмоциональную сферу и вегетативную нервную систему. Таким образом, воздействие эфирного масла многогранно и охватывает практически все системы организма. Основные химические компоненты эфирных масел — линалоол, альдегиды, терпен, гераниол, пиены, камфора, фенолы; в том числе кетоны, борнеолы, в том числе терпены. Гуморальный путь ароматических воздействий на организм осуществляется благодаря обильной сети капилляров дыхательных путей и альвеол легких. Это обеспечивает быстрое всасывание эфирных масел в кровь (в 20 раз быстрее по сравнению с приемом их внутрь в виде настоев и отваров). Богатая капиллярная сеть кожи также предопределяет легкое проникновение ароматических веществ [3–7]. Доказано, что лечебный эффект эфирных масел связан не только с их запахом, но и с другими механизмами

воздействия на организм. Попадая в организм человека, биологически активные вещества способны изменить его эмоциональное состояние и различные физиологические параметры: ритм дыхания, сердцебиений, мышечный и сосудистый тонус, сердечный выброс и уровень течения ряда биохимических процессов [8].

В настоящее время имеются достаточно убедительные научные исследования, доказывающие, что раздражение полости носа различными ароматами способно оказывать многообразное и сложное влияние практически на все функции организма.

На фоне действия запахов изменяется общая активность коры головного мозга и его кровообращение [9].

Таким образом, можно говорить о наличии следующих видов воздействия при попадании летучих фитоорганических веществ растений в организм человека посредством обоняния: прямое местное воздействие на органы дыхания и общее воздействие (нервно-рефлекторное и гуморальное) [8].

Целью данной работы явилось исследование влияния эфирного масла кедра на сердечно-сосудистую деятельность человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на базе автотранспортного предприятия г. Симферополя. Эксперимент проводился в течение месяца в 5 повторностях с интервалом в два дня. В эксперименте принимали участие 30 мужчин в возрасте от 40 до 55 лет. Методом отбора были разделены на две группы: первая – контрольная (30 человек), вторая – экспериментальная (15 человек). Измерялось артериальное давление в начале, в процессе, и в конце исследования. Опытная группа подвергалась воздействию метода аппаратной ароматерапии.

Проведение процедуры. Аппаратная ароматерапия проводилась на базе медицинского кабинета, аппаратом «Фитотрон». Продолжительность процедуры составляла 30 минут. Для определения чувствительности организма к эфирному маслу кедр проводили кожную и обонятельную пробы.

Статистический анализ результатов исследования. Полученные в экспериментах данные подвергали статистической обработке с использованием пакета прикладных программ Statistica 5.5. В модуле основных статистических характеристик выборочных совокупностей вычисляли средние значения, дисперсию, стандартное отклонение, ошибку средней арифметической, доверительные интервалы.

Для решения вопроса о степени соответствия распределений нормальной кривой вычисляли показатели асимметрии и эксцесса а также использовали тест на нормальность распределения Смирнова-Колмогорова. В отдельных случаях производили сопоставление статистических заключений, полученных посредством параметрических и непараметрических критериев.

Для сопоставления результатов, полученных на двух несвязанных выборках (контрольная и экспериментальная группы), применялся критерий Стьюдента, если соблюдались условия возможности его использования: нормальность распределения

и количественный характер вариации. При нарушении этих условий применяли альтернативный критерий Манна-Уитни, близкий по статистической мощности к критерию Стьюдента. Расчеты производились по формуле

$$U = (n_1 \times n_2) + \frac{n_x \times (n_x + 1)}{2} - T_x$$

Нулевая гипотеза отклонялась, если фактическое

значение критерия оказывалось меньше табличного.

Для анализа динамики показателей по пяти временным точкам использовался непараметрический аналог дисперсионного анализа - критерий Фридмана:

$$X_r^2 = \left[\left(\frac{12}{n \cdot c(c+1)} \right) \cdot \left(\sum R_i^2 \right) \right] - 3 \cdot n(c+1)$$

Нулевая гипотеза отклонялась, если фактическое значение критерия превышало критическое табличное значение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние ароматерапии на артериальное давление. Приводимый ниже график иллюстрирует показатели артериального давления у испытуемых контрольной группы до, и после имитации вдыхания паров масла. Цифры в подписях рисунков соответствуют порядковому номеру эксперимента.

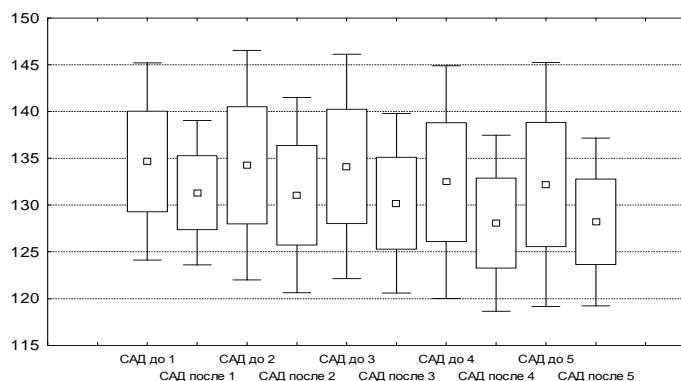


Рис. 1. Результаты регистрации систолического артериального давления (САД) в контрольной группе.

Примечание: По оси ординат: величина артериального давления в мм рт. ст.

Здесь, и на последующих графиках: \square - среднее арифметическое; \square - доверительный интервал выборочной средней; $[\]$ - доверительный интервал средней арифметической генеральной совокупности.

Как видно из рисунка во всех пяти экспериментах с мнимым вдыханием паров масла различия были недостоверны. На это указывает перекрытие доверительных интервалов не только генеральных, но и выборочных средних. Небольшое снижение артериального давления в конце эксперимента – на 2-3 мм. ртутного столба, может

объясняться тем, что сама процедура размеженного глубокого дыхания, даже при отсутствии паров масла, вызывала мышечную и психологическую релаксацию.

В таблице 1 содержатся результаты статистического анализа регистрируемого показателя.

Таблица 1
Общая статистическая характеристика показателей систолического артериального давления в контрольной группе

ПОКАЗАТЕЛЬ	n	Среднее значение	Миним. значение	Максим. значение	Дисперсия	Ошибка средней
САД до 1	15	134,67	127	149	28,94	1,39
САД после 1	15	131,33	125	139	15,52	1,02
САД до 2	15	134,27	125	150	39,18	1,62
САД после 2	15	131,07	124	143	28,30	1,37
САД до 3	15	134,13	125	148	37,45	1,58
САД после 3	15	130,20	122	139	24,1	1,27
САД до 4	15	132,47	123	147	40,32	1,64
САД после 4	15	128,07	120	137	23,04	1,24
САД до 5	15	132,20	121	148	44,22	1,72
САД после 5	15	128,20	120	135	20,88	1,18

Ситуация коренным образом изменяется, в экспериментальной группе, где испытуемые действительно вдыхали пары масла (рис. 2). Для любого из пяти экспериментов гипотензивный эффект ароматерапии был статистически достоверен ($p < 0,01$), о чем наглядно свидетельствуют значительно отстоящие друг от друга доверительные интервалы первых (до воздействия) и второй (после него) регистраций. Среднее значение разницы показателя до и после экспериментального воздействия составило $6,68 \pm 0,25$ мм.рт.ст. Обращает на себя внимание эффект кумуляции гипотензивного действия аромотерапии. Так, если в первой регистрации до начала вдыхания паров масла уровень артериального давления составлял $136,8 \pm 1,38$ мм.рт.ст., то к началу третьего эксперимента он снизился до $134,3 \pm 1,30$ мм.рт.ст., а к завершающему пятому опыту уменьшился до $132,0 \pm 1,21$ мм.рт.ст. Так же на протяжении всей серии происходило все более выраженное накопление гипотензивного эффекта вдыхания паров масла от $130,5 \pm 1,28$ мм.рт.ст. в первом эксперименте, до $125,1 \pm 0,82$ мм.рт.ст. в пятом опыте. При этом доверительные интервалы указанных значений переменной не перекрывались. Применение критерия Фридмана для связанных выборок позволило сделать вывод о статистической достоверности наблюдаемой динамики показателя ($p < 0,01$).

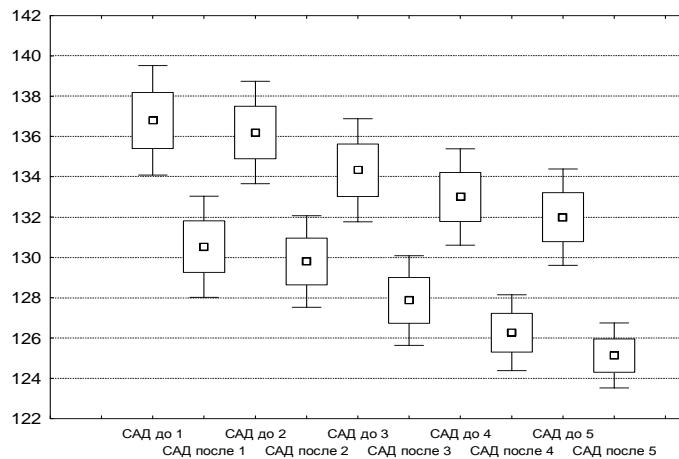


Рис. 2. Результаты регистрации систолического артериального давления (САД) в экспериментальной группе

Примечание: по оси ординат: величина артериального давления в мм. рт. ст.

Анализируя таблицу 2, можно также заметить, что к концу серии экспериментов регистрируется снижение вариабельности показателя. Так, отношение дисперсий в начале первого опыта к концу завершающего эксперимента ($F = 28,74 / 10,12$) дает значение 2,83, что превышает критическое значение критерия Фишера (2,40) и позволяет сделать заключение о стабилизации уровня артериального давления под влиянием ароматерапии ($p < 0,05$).

Для решения вопроса о достаточности объемов наблюдений производили расчет показателя точности (Sc), характеризующего степень приближения выборочных средних арифметических к средним арифметическим генеральных совокупностей, выраженную в процентах. Как известно, для общебиологических исследований величина показателя Sc , вычисляемого как отношение стандартной ошибки к средней арифметической, не должна превышать 5%, а для медицинских экспериментов – не более 3% [10]. Значения показателя точности для контрольной группы находились в интервале от 0,8% до 1,2%, а для экспериментальной – в диапазоне от 0,7% до 1,1%, что свидетельствовало о значительной близости выборочных и генеральных параметров и достаточности объема проведенных регистраций.

Вполне ожидаемо, что и в диастолической составляющей артериального давления как и в его систолической компоненте, наблюдалась схожая динамика показателей. При этом график, характеризующий значения систолического артериального давления в контрольной группе (рис. 1), принципиально схож с графиком, иллюстрирующим контрольные регистрации диастолического давления (рис. 3).

Таблица 2

Общая статистическая характеристика показателей систолического артериального давления в экспериментальной группе

ПОКАЗАТЕЛЬ	n	Среднее значение	Миним. значение	Максим. значение	Дисперсия	Ошибка средней
САД до 1	15	136,80	127	149	28,74	1,38
САД после 1	15	130,53	121	142	24,55	1,28
САД до 2	15	136,20	125	145	25,17	1,30
САД после 2	15	129,80	120	140	20,03	1,16
САД до 3	15	134,33	123	142	25,52	1,30
САД после 3	15	127,87	119	139	19,27	1,13
САД до 4	15	133,00	124	140	22,29	1,22
САД после 4	15	126,27	120	133	13,92	0,96
САД до 5	15	132,00	122	138	22,14	1,21
САД после 5	15	125,13	120	130	10,12	0,82

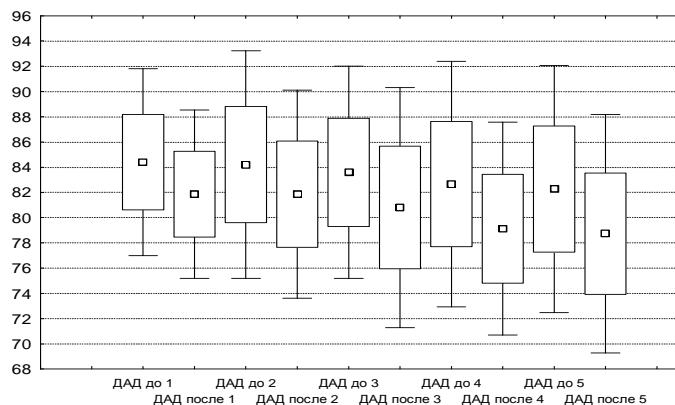


Рис. 3. Результаты регистрации диастолического артериального давления (ДАД) в контрольной группе

Примечание: по оси ординат: величина артериального давления в мм рт. ст.

На графике хорошо видно, что для всех пяти экспериментов перекрываются доверительные интервалы не только средних арифметических генеральных совокупностей, но и выборочных средних, что указывает на случайность наблюдаемых различий. Также как и относительно систолического артериального давления, незначительное снижение диастолического показателя к концу каждого из пяти экспериментов, может объясняться мышечной релаксацией испытуемых при его проведении.

Ниже приводится таблица 3, содержащая результаты статистического анализа показателей диастолического артериального давления в контрольной группе.

Диапазон колебаний средних величин диастолического артериального давления от опыта к опыту находился в интервале от $82,3 \pm 1,29$ мм.рт.ст. до $84,1 \pm 0,97$ мм.рт.ст. до воздействия, и в диапазоне от $79,0 \pm 1,24$ мм.рт.ст. до $81,9 \pm 0,88$ мм.рт.ст. после имитации вдыхания паров масла. Значения показателя точности Sc не превышали 3%, что свидетельствовало о достаточности объема наблюдений.

Существенно иная картина наблюдалась в экспериментальной группе, где испытуемые действительно вдыхали пары масла. Происходящие при этом изменения представлены на рисунке 4 и в таблице 4.

Таблица 3
Общая статистическая характеристика показателей диастолического артериального давления в контрольной группе

ПОКАЗАТЕЛЬ	п	Среднее значение	Миним. значение	Максим. значение	Дисперсия	Ошибка средней
ДАД до 1	15	84,10	78	91	14,26	0,97
ДАД после 1	15	81,87	76	87	11,55	0,88
ДАД до 2	15	84,02	76	92	21,17	1,19
ДАД после 2	15	81,87	76	90	17,70	1,09
ДАД до 3	15	83,60	76	90	18,40	1,11
ДАД после 3	15	80,80	73	89	23,60	1,25
ДАД до 4	15	82,67	74	88	24,67	1,28
ДАД после 4	15	79,13	72	86	18,55	1,11
ДАД до 5	15	82,27	72	90	24,92	1,29
ДАД после 5	15	79,03	70	87	23,21	1,24

График динамики изменений диастолического давления в экспериментальной группе (рис. 4) был схож с графиком показателей систолического артериального давления при вдыхании паров кедрового масла (рис. 2).

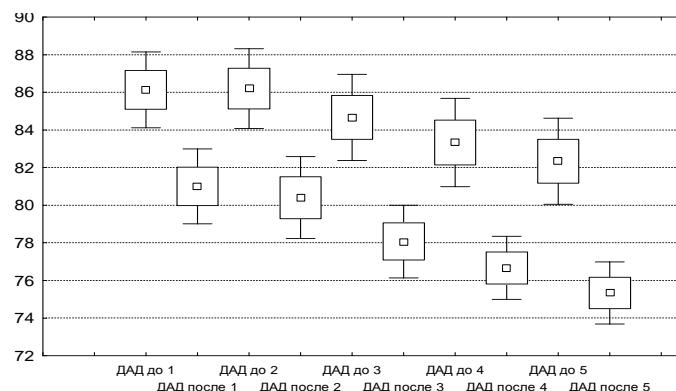


Рис. 4. Результаты регистрации диастолического артериального давления (ДАД) в экспериментальной группе

Примечание: по оси ординат: величина артериального давления в мм. рт. ст.

Во всех пяти последовательных экспериментах происходило статистически достоверное снижение диастолического давления крови после вдыхания паров масла ($p < 0,01$). Причем эффект усиливался от опыта к опыту: если в первом эксперименте воздействие масла снизило уровень диастолического давления на 5,9 мм рт. ст., то в пятом эксперименте – на 7,0 мм рт. ст. Результаты анализа Фридмана и в данном случае позволили сделать вывод о достоверности динамики происходящих событий ($p < 0,05$).

Уровень диастолического давления в экспериментальной группе до начала ароматерапии ($86,1 \pm 1,03$ мм.рт.ст.) был даже несколько выше, чем в контрольной ($84,1 \pm 0,97$ мм.рт.ст., однако эти различия не были статистически значимыми, что указывало на корректность формирования выборок и возможности проведения экспериментов.

Величина показателя точности Sc находилась в интервале от 1,1% до 1,4%, что не превышало критический трехпроцентный уровень для исследований медицинской направленности.

Величина показателя точности Sc находилась в интервале от 1,1% до 1,4%, что не превышало критический трехпроцентный уровень для исследований медицинской направленности.

Таблица 4
Общая статистическая характеристика показателей диастолического артериального давления в экспериментальной группе

ПОКАЗАТЕЛЬ	n	Среднее значение	Миним. значение	Максим. значение	Дисперсия	Ошибка средней
ДАД до 1	15	86,13	77	93	15,98	1,03
ДАД после 1	15	81,00	72	89	15,57	1,02
ДАД до 2	15	86,20	76	92	17,46	1,08
ДАД после 2	15	80,40	70	88	18,54	1,11
ДАД до 3	15	84,67	74	90	20,38	1,17
ДАД после 3	15	78,07	70	87	14,64	0,99
ДАД до 4	15	83,33	74	90	21,38	1,19
ДАД после 4	15	76,67	72	83	10,95	0,85
ДАД до 5	15	82,33	73	87	20,52	1,17
ДАД после 5	15	75,33	70	80	10,52	0,84

Влияние ароматерапии на частоту сердечных сокращений. Исходя из анализа представленного материала, характеризующего влияние ароматерапии на артериальное давление, можно было ожидать, что и на частоту сердечных сокращений вдыхание паров масла будет оказывать сходное понижающее действие. Таблица 5 содержит данные, характеризующие этот показатель в контрольной группе.

Таблица 5
Общая статистическая характеристика частоты пульса в контрольной группе

ПОКАЗАТЕЛЬ	n	Среднее значение	Миним. значение	Максим. значение	Дисперсия	Ошибка средней
ЧСС до 1	15	75,67	68	82	10,52	0,84
ЧСС после 1	15	74,93	67	79	9,98	0,82
ЧСС до 2	15	75,47	67	82	15,84	1,03
ЧСС после 2	15	74,63	65	79	10,98	0,86
ЧСС до 3	15	75,20	67	80	10,03	0,82
ЧСС после 3	15	74,32	66	76	10,78	0,85
ЧСС до 4	15	73,40	65	79	11,26	0,87
ЧСС после 4	15	72,93	63	77	10,55	0,84
ЧСС до 5	15	73,13	63	79	18,70	1,12
ЧСС после 5	15	72,80	63	75	11,03	0,86

Различия между частотой пульса до и после имитации воздействия в каждом из пяти опытов были недостоверными. Среднее значение частоты сердечных сокращений до начала имитации воздействия по всем пяти экспериментам составило 74,6 цикла в минуту, а по их окончании – 73,9 цикла в минуту. Таким образом, снижение уровня показателя не превысило 1% от исходной величины, принимаемой за 100%.

Результаты, полученные в группе с реальным воздействие паров масла, представлены в следующей таблице:

Таблица 6
Общая статистическая характеристика частоты пульса в экспериментальной группе

ПОКАЗАТЕЛЬ	n	Среднее значение	Миним. значение	Максим. значение	Дисперсия	Ошибка средней
ЧСС до 1	15	76,33	70	82	11,38	0,87
ЧСС после 1	15	71,62	68	76	5,84	0,62
ЧСС до 2	15	76,40	72	81	7,40	0,70
ЧСС после 2	15	71,14	67	76	7,92	0,73
ЧСС до 3	15	75,13	70	80	9,27	0,79
ЧСС после 3	15	70,03	66	74	4,92	0,57
ЧСС до 4	15	74,13	68	79	10,41	0,83
ЧСС после 4	15	69,13	66	74	3,52	0,48
ЧСС до 5	15	72,73	68	77	7,92	0,73
ЧСС после 5	15	68,04	64	72	4,50	0,55

Общий диапазон средних значений в экспериментальной группе (от 76 до 68 ц./мин.) был существенно больше, чем в контрольной (от 76 до 73 единиц

сердечного цикла). Из сопоставления цифр, очевидно, что расширение интервала средних в экспериментальной группе происходит не за счет повышения верхней границы показателя, а вследствие снижения его нижнего уровня. Это может расцениваться как еще одно подтверждение положительного воздействия аромотерапии на показатели сердечно-сосудистой системы.

Примечательно, что диапазон значений дисперсии в экспериментальной группе после воздействия парами кедрового масла (от 3,52 до 7,92) оказался значительно меньше по абсолютным величинам в сравнении с дисперсией частоты пульса после ложной ароматерапии (от 9,98 до 11,03). Это опять же может расцениваться к стабилизирующий эффект ароматерапии на показатели сердечно-сосудистой системы.

Среднее значение частоты пульса до начала вдыхания паров кедрового масла по результатам всех пяти экспериментов составило 74,9 ц./мин., а после экспериментального воздействия 68,9 ц./мин. Снижение было статистически достоверным и составляло 9,3% от исходной величины, принимаемой за 100% ($p < 0,01$).

Попарные сопоставления частоты сокращений сердца до и после вдыхания паров масла в экспериментальной группе, представлены на следующем графике.

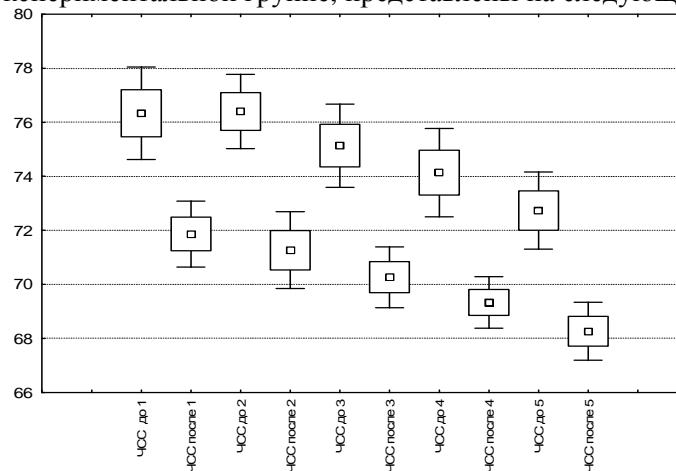


Рис. 5. Результаты регистрации частоты пульса в экспериментальной группе
Примечание: по оси ординат: частота сердечных сокращений в ц./мин.

Также как и в предшествующих случаях в каждом из экспериментов происходит статистически значимое снижение частоты сердечных сокращений после вдыхания паров кедрового масла ($p < 0,01$), на что наглядно указывает значительное расхождение доверительных интервалов в каждой паре регистраций.

Общий вектор наблюдаемых изменений пульса близко повторяет динамику событий при регистрации систолической и диастолической составляющих артериального давления. Результаты анализа Фридмана подтверждают вывод о достоверности эффекта кумуляции экспериментального воздействия во времени ($p < 0,05$).

ВЫВОДЫ

1. Установлено статистически достоверное ($p < 0,01$) гипотензивное действие паров кедрового масла. Систолическое давление в среднем понижается на $6,68 \pm 0,25$ мм.рт.ст., диастолическое – на $6,35 \pm 0,25$ мм.рт.ст. Выявлено усиление гипотензивного эффекта при повторных сеансах ароматерапии ($p < 0,05$).
2. Выявлено снижение частоты сердечных сокращений при проведении процедур ароматерапии. Средняя частота пульса до начала вдыхания паров масла имела значение $74,9 \pm 0,97$ ц./мин., а после экспериментального воздействия $68,9 \pm 0,65$ ц./мин. Снижение было статистически достоверным и составляло 9,3% от исходной величины, принимаемой за 100% ($p < 0,01$).

Список литературы

1. Гиппократ. Избранные книги. / Гиппократ. - Москва, Свароч, 1994. – 736с.
2. Голота Л.Г. Биологическая активность и фармакологические свойства эфирных масел мяты, лаванды, шалфея. / Л.Г. Голота, И.В. Нищенковская // Фармакология и токсикология. - Киев, 1991. – Вып. 26. – С.90—94.
3. Гурвиц Б.Я. Новый концептуальный подход к ранней диагностике рака / Б.Я. Гурвиц, Б.А.Крылов, К.П. Коротков // Сознание и физическая реальность. – 1998. – Т. 3, № 1 – С.51—57.
4. Николаевский В.В. Биологическая активность эфирных масел / Николаевский В.В., Еременко А.Е., Иванов И.К. – М.: Медицина, 1987. – 144 с.
5. Стикс Вольфган. В царстве запахов. Эфирные масла и их действия / Вольфган Стикс, В. Улла. - М.: Турбо-принт, 1995. – 128 с.
6. Червинская А.В. Перспективы применения аппаратной ароматерапии в медицинской практике / А.В. Червинская // AquaVstae. Российский медицинский журнал. – 1999. – №2. – С. 15.
7. Червинская А.В. Управляемые дыхательные среды в профилактике и восстановительном лечении / А.В. Червинская // Кремлевская медицина. Клинический вестник. – 2003. – №3. – С. 75–80.
8. Нагорная Н.В. Ароматерапия в педиатрии / Нагорная Н.В. – Cosmetic Karl Hadek International? 1998.
9. Макарчук Н.Е. Обоняние и поведение / Макарчук Н.Е., Калуев А.В. – Киев, 2000.
10. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика [Изд. 3-е, испр.] / Рокицкий П.Ф. – Минск «Вышэйш. Шкода», 1973. – 320 с.

Янцев О.В. Вплив ефірного масла кедра на серцево-судинну систему / О.В. Янцев, А.В. Кириллова, С.А. Панова, О. Майданська // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2012. – Т. 25 (64), № 3. – С. 256-266.

Встановлено статистично достовірне гіпотензивна дія парів кедрового масла. Було відзначено зниження як систолічного і діастолічного тиску. Виявлено також статистично достовірне зниження частоти серцевих скорочень при проведенні процедур ароматерапії.

Ключові слова: ароматерапія, ефірне масло, артеріальний тиск, систолічний тиск, діастолічний тиск, частота серцевих скорочень.

Yancev A.V. Study effect of essential oil of cedar on the cardiovascular system / A.V. Yancev, A.V. Kirillova, S.A. Panova, O.D. Maidanskaya // Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No 2. – P. 256-266.

Found a statistically significant hypotensive effect of vapours of cedar oil. It was noted a decrease in systolic and diastolic blood pressure. It was also revealed a statistically significant reduction in the frequency of cardiac contractions during the procedures, aromatherapy.

Keywords: aromatherapy, essential oil, blood pressure, systolic blood pressure, diastolic blood pressure, heart rate.

Поступила в редакцию 22.09.2012 г.

ХИМИЧЕСКИЕ НАУКИ

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

Серия «Биология, химия». Том 25 (64). 2012. № 3. С. 267-270.

УДК 539.194

ПРИМЕНЕНИЕ ФАКТОРНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ УСЛОВИЙ ЭКСПЕРИМЕНТА, МИНИМИЗИРУЮЩИХ ОТНОСИТЕЛЬНУЮ ПОГРЕШНОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНСТАНТЫ РАВНОВЕСИЯ ОБРАЗОВАНИЯ КОМПЛЕКСОВ С ВОДОРОДНОЙ СВЯЗЬЮ

Валиев Э.В., Шейх-Заде М.И.

*РВУЗ «Крымский инженерно-педагогический университет», Симферополь, Украина
E-mail: envervaliyev@ukr.net*

Получены математические модели влияния отношения $\gamma = C_0^B/C_0^A$ между исходными концентрациями донора C_0^A и акцептора C_0^B протона, К и C_0^A на относительную погрешность ε_K константы равновесия К процесса образования комплексов с водородной связью при отсутствии самоассоциации донора протона. На основе анализа этих моделей выявлены наиболее значимые факторы, влияющие на ε_K . Определены области значений γ , минимизирующие величину ε_K .

Ключевые слова: водородная связь, константа равновесия, относительная погрешность, факторный эксперимент, математическая модель.

ВВЕДЕНИЕ

При исследовании термодинамических характеристик реакции образования комплексов с водородной связью



широко применяется метод ИК-спектроскопии. При этом важное значение приобретают вопросы, связанные с анализом погрешностей определения термодинамических характеристик реакции (1). Рассмотрение влияния ряда факторов на точность количественного анализа проведено, например, в [1–3]. В работе [4] изучено влияние γ на ε_K . При этом было обнаружено, что значения ε_K зависят также от К и C_0^A .

Целью данной работы было оценить, какие из величин γ , К, C_0^A оказывают преимущественное влияние на значение ε_K , что позволит реализовать условия эксперимента, при которых значение ε_K будет меньше заранее заданной величины ε .

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для решения поставленной задачи удобно воспользоваться методами планирования эксперимента (факторного эксперимента, факторного анализа) [5], с помощью которого можно получить математическую модель влияния γ , K , C_0^a на значение ε_K . В соответствии с терминологией, принятой в факторном эксперименте, величины γ , K , C_0^a будем называть факторами, а ε_K – критерием оптимизации. Так как количество факторов невелико (три), было принято решение провести полный факторный эксперимент (ПФЭ) типа 2^3 с варьированием факторов на двух уровнях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исходные факторы имеют различные размерности, различные масштабы измерений и диапазоны изменений. Это затрудняет как построение математической модели, так и сравнение влияния факторов на критерий оптимизации. Поэтому в факторном эксперименте переходят к кодированным факторам, которые являются безразмерными и имеют единый масштаб измерения. Геометрически это означает, что экспериментальные точки плана 2^3 располагаются в безразмерном факторном пространстве в вершинах куба.

Обозначим кодированные значения факторов γ , K , C_0^a через x_1 , x_2 , x_3 соответственно. Введем также обозначение $\varepsilon_K = y$. Матрица планирования ПФЭ типа 2^3 приведена в табл. 1.

Таблица 1
Матрица планирования ПФЭ типа 2^3 в кодированных величинах

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
x_0	x_1	x_2	x_3	$x_1 \cdot x_2$	$x_1 \cdot x_3$	$x_2 \cdot x_3$	$x_1 \cdot x_2 \cdot x_3$	$y_r 10^2$	$y_{IIr} 10^2$
+	+	+	+	+	+	+	+	11,04	7,46
+	-	+	+	-	-	+	-	14,14	7,89
+	+	-	+	-	+	-	-	13,27	7,52
+	-	-	+	+	-	-	+	17,84	8,00
+	+	+	-	+	-	-	-	13,27	7,52
+	-	+	-	-	+	-	+	17,84	8,00
+	+	-	-	-	-	+	+	16,87	7,61
+	-	-	-	+	+	+	-	23,78	8,18

Такая матрица планирования позволяет определить значения коэффициентов уравнения регрессии

$$\hat{Y} = b_0 + b_1 \cdot x_1 + b_2 \cdot x_2 + b_3 \cdot x_3 + b_{12} \cdot x_1 \cdot x_2 + b_{13} \cdot x_1 \cdot x_3 + b_{23} \cdot x_2 \cdot x_3 + b_{123} \cdot x_1 \cdot x_2 \cdot x_3, \quad (2)$$

которая и представляет собой искомую математическую модель.

В работе [4] показано, что при $\gamma > 1$ в факторном пространстве можно условно выделить две области: область I ($K < 100$ л/моль, $C_0^a < 2 \cdot 10^{-3}$ моль/л, ε_K неприемлемо велики) и область II ($K > 100$ л/моль, $C_0^a > 2 \cdot 10^{-3}$ моль/л, ε_K приемлемо малы). В области I для факторов γ , K , C_0^a нулевой уровень был выбран равным 5, 100 л/моль,

$2 \cdot 10^{-3}$ моль/л, в области II 5, 500 л/моль, 0,02 моль/л, соответственно. Интервал варьирования каждого фактора выбран равным $\pm 25\%$ от его значения на нулевом уровне.

Значения y для областей I и II, полученные с использованием этих данных, указанной выше матрицы планирования и формулы (3) из [4], представлены в табл. 1 в столбцах 9 и 10, соответственно. По этим данным были получены уравнения регрессии для области I:

$$\begin{aligned} \hat{y}_I = & (160,04 - 23,95 \cdot x_1 - 19,33 \cdot x_2 - 19,33 \cdot x_3 + 4,76 \cdot x_1 \cdot x_2 + \\ & + 4,76 \cdot x_1 \cdot x_3 + 4,51 \cdot x_2 \cdot x_3 - 1,10 \cdot x_1 \cdot x_2 \cdot x_3) \cdot 10^{-3} \end{aligned} \quad (3)$$

и для области II:

$$\begin{aligned} \hat{y}_{II} = & (77,71 - 2,46 \cdot x_1 - 0,53 \cdot x_2 - 0,53 \cdot x_3 + 0,18 \cdot x_1 \cdot x_2 + \\ & + 0,18 \cdot x_1 \cdot x_3 + 0,13 \cdot x_2 \cdot x_3 - 0,04 \cdot x_1 \cdot x_2 \cdot x_3) \cdot 10^{-3} \end{aligned} \quad (4)$$

Для оценки значимости коэффициентов в уравнениях (3) и (4) нужно знать величину дисперсии воспроизводимости $s^2_{\{y\}}$ [5]. Данная работа представляет собой по существу вычислительный эксперимент [6]. Специфика вычислительного эксперимента такова, что значение $s^2_{\{y\}}$ оказывается равным нулю. Это связано с тем, что в каждой строке матрицы планирования $\bar{y}_u = y_{uj}$, где u – номер строки матрицы, \bar{y}_u – среднее арифметическое значение y в u -той строке, y_{uj} – результаты отдельного вычисления в u -той строке, j – номер отдельного вычисления в u -той строке ($j=1, 2, \dots, n$), n – число вычислений в u -той строке. Поэтому нет возможности строгой оценки значимости коэффициентов в уравнениях (3) и (4). По этой же причине нет возможности строгой проверки адекватности полученных моделей с помощью критерия Фишера [5]. Оценку адекватности полученных моделей можно провести косвенным образом путем сравнения значений y_u , полученных по формуле (3) из [4] и значений \hat{y}_u , вычисленных по уравнениям (3) и (4). Расчеты показали, что эти значения совпадают.

Уравнения (3) и (4) можно упростить без существенной потери точности результатов. Расчеты показали следующее.

1. В уравнении (3) можно отбросить последнее слагаемое, которое соответствует тройному взаимодействию факторов. Это приводит к погрешности в 0,5–1%, что приемлемо для области I.
2. Аналогичная процедура для уравнения (4) приводит к погрешности в 0,05%, что не играет практической роли.
3. В уравнении (4) можно отбросить все слагаемые, соответствующие двойным (парным) взаимодействиям факторов. Это приводит к погрешности в 0,6%, что является приемлемым в области II.

Анализ численных значений и знаков коэффициентов линейных членов уравнений (3) и (4) показывает, что в области I все три фактора оказывают примерно одинаковое влияние на критерий оптимизации. Двойное взаимодействие факторов играет существенную роль. Для достижения значений ε_K примерно в 8–10% нужно использовать значения $\gamma > (20–30)$. В области II доминирующим фактором является x_1 , факторы x_2 , x_3 играют менее заметную роль. Двойное

взаимодействие факторов практически незаметно (со сделанными выше оговорками). Для достижения значений ε_K примерно в 8% нужно использовать значения $\gamma > 5$.

ВЫВОДЫ

1. Получены математические модели влияния γ , K , C_0^a на значение ε_K .
2. Выявлены наиболее значимые факторы, влияющие на значение ε_K .
3. Определены значения γ , при использовании которых значения ε_K могут быть меньше заранее заданной величины ε .

Список литературы

1. Смит А. Прикладная ИК-спектроскопия / А. Смит. – М.: Мир, 1982. – 328 с.
2. Булатов М.И. Практическое руководство по фотоколориметрическим и спектрофотометрическим методам анализа / М.И. Булатов, И.П. Калинкин. – Л.: Химия, 1976. – 376 с.
3. Кесслер И. Методы инфракрасной спектроскопии в химическом анализе / И. Кесслер. – М.: Мир, 1964. – 287 с.
4. Валиев Э.В. О минимизации относительной погрешности спектрофотометрического определения константы равновесия образования комплексов с водородной связью / Э.В. Валиев, М.И. Шейх-Заде // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия» – Т. 25(64). – 2012. – С. 224–227.
5. Тихомиров В.Б. Планирование и анализ эксперимента / В.Б. Тихомиров. – М.: Легкая индустрия, 1974. – 263 с.
6. Основы научных исследований / Под ред. В.И. Крутова и В.В. Попова. – М.: Высшая школа, 1989. – 400 с.

Валиев Е.В. Застосування факторного аналізу для виявлення умов експерименту, що мінімізують відносну похибку визначення константи рівноваги утворення комплексів з водневим зв'язком / Е.В. Валиев, М.І. Шейх-Заде // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2012. – Т. 25 (64), № 3. – С. 267-270.

Отримано математичну модель впливу відношення $\gamma = C_0^b/C_0^a$ між вихідними концентраціями донора C_0^a і акцептора C_0^b протона, K і C_0^a на відносну похибку ε_K константи рівноваги K процесу утворення комплексів з водневим зв'язком при відсутності самоассоціації донора протона. На основі аналізу цих моделей виявлені найбільш значущі фактори, що впливають на ε_K . Визначено області значень γ , які мінімізують величину ε_K .

Ключові слова: водневий зв'язок, константа рівноваги, відносна похибка, факторний експеримент, математична модель.

Valiev E.V. The application of factor analysis to identify experimental conditions that minimize the relative error in determining the equilibrium constant for the formation of complexes with hydrogen bond. / E.V. Valiev, M.I. Sheikh-Zade // Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No. 3. – P. 267-270.

Obtained the mathematical model of the influence of relationship $\gamma = C_0^b/C_0^a$ between initial concentrations of proton donor C_0^a and acceptor C_0^b , K and C_0^a on the relative error ε_K of the complexes with hydrogen bond formation process equilibrium constant K in the absence of the proton donor self-association. Based on the analysis of these models revealed the most significant factors affecting the ε_K . Defined γ values range minimizing the amount ε_K .

Keywords: hydrogen bond, equilibrium constant, relative error, factorial experiment, mathematical model.

Поступила в редакцию 27.09.2012 г

УДК 577.152.193

ПРОБЛЕМЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПЕРОКСИДАЗ

Вяткина О.В.

*Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Украина
E-mail: oksana_yuatkina@list.ru*

В статье проведен анализ существующих методов выделения пероксидаз из растительного сырья и их очистки, указано, что ни один из них не является универсальным. Приведены результаты исследований, которые подтверждают влияние природы экстрагента на каталитическую активность пероксидазы редьки черной.

Ключевые слова: пероксидаза, экстракция, фракционирование, черная редька.

ВВЕДЕНИЕ

Ферментативный катализ – один из самых перспективных процессов в различных сферах промышленности, науки и медицины. Он обладает множеством особенностей, которые делают использование ферментов более выгодным по сравнению с обычными катализаторами. В промышленных биокатализических процессах широко используются различные ферменты, но особый интерес представляют собой оксидоредуктазы, в частности растительные пероксидазы [1].

Классическая пероксидаза – двухкомпонентный, двухсубстратный фермент, представляющий собой сочетание активной группы (протогематина IX), выполняющего роль активного центра и коллоидного белкового «носителя», проявляющий высокую специфичность в отношении окислителя – пероксида водорода. Среди субстратов пероксидазы встречаются вещества различной природы, но одними из наиболее легко окисляемых субстратов являются фенолы [2, 3].

В настоящее время наиболее изученной и имеющей активное применение является пероксидаза хрена. Современная технология получения пероксидазы трудоемка, низко продуктивна и связана с использованием сезонного сырья, дорогостоящих импортных хроматографических сорбентов [4–7]. Это определяет и высокую стоимость фермента – стоимость препаратов пероксидазы фирмы «Sigma» варьируется от семи до двух тысяч долларов за 1 грамм в зависимости от качества препарата. Поэтому поиск новых растительных источников пероксидазы и разработка методов её выделения являются актуальной задачей.

При работе с растениями необходимо учитывать некоторые сложности: вариабельность материала, выращенного в открытом грунте, малое содержание белка в экстрактах растений. Кроме того, исследования строения и функций ферментов предполагают наличие высокоочищенных препаратов. Получение же фермента в гомогенном состоянии – достаточно сложная задача. Как правило,

биологический материал, являющийся источником выделения, содержит большое число белков, их комплексов друг с другом и другими биополимерами. Близкие свойства компонентов этой смеси требуют при выделении индивидуальных белков использования разнообразных методов и различных их сочетаний. Трудности получения чистого белка связаны также с лабильностью белков и опасностью их денатурации, что сужает круг возможных методов выделения.

Очистка нативных ферментных препаратов состоит в основном из серии фракционирования. В настоящее время пользуются относительно небольшим числом стандартных приемов, которые оказались особенно эффективными и удобными. Обычно на начальной стадии фракционирования используют либо приём снижения pH системы, что приводит к осаждению большинства нуклеопротеидов, или фракционную денатурацию нагреванием до температуры чуть ниже температуры денатурации фермента, при которой осаждаются большинство балластных белков [8].

Фракционирование органическими растворителями – один из стандартных приемов разделения белков. Чаще всего для этого используют ацетон, этиловый спирт и трихлоруксусную кислоту в сочетании с водными растворами электролитов (например, с сульфатом аммония). Для получения хороших результатов при фракционировании белков ацетоном требуется низкая концентрация электролитов (менее чем M/30), и поэтому желательно предварительно диализовать белковый раствор. Поскольку большинство ферментов инактивируются органическими растворителями при комнатной температуре, необходимо принимать специальные меры для поддержания низкой температуры на всем протяжении работы [9].

Фракционирование солями применяется очень широко. Чаще всего для фракционирования белков употребляют сульфат аммония, так как он хорошо растворим в воде и на большую часть ферментов не оказывает негативного действия. Более того, на многие ферменты он оказывает даже стабилизирующее действие, и потому при работе с ним нет необходимости проводить фракционирование белков при низкой температуре. Даже чистые препараты сульфата аммония имеют слабокислую реакцию; поэтому следует тщательно контролировать pH. Для того чтобы не увеличивать объем, к белковому раствору обычно добавляют твердую соль. Точная концентрация соли, при которой начинается высыливание, определяется не только значением pH, температурой и природой соли, но также и концентрацией фермента [9, 10].

Фракционную адсорбцию можно проводить двумя способами: при первом способе последовательно при перемешивании вносят адсорбент в раствор фермента и затем каждую порцию отделяют центрифугированием. При втором способе ферментный раствор пропускают через колонку с адсорбентом и с помощью коллектора собирают фракции элюата. В первом методе в случае адсорбции фермента его отделяют от других компонентов раствора, а затем экстрагируют или элюируют с адсорбента. Если же фермент не адсорбируется, то обработку адсорбентом можно использовать для удаления из раствора фермента балластных веществ [11].

Различия в скорости перемещения различных белков (как электролитов) в электрическом поле послужили основой для разработки электрофоретических методов очистки ферментов. Большинство из них применимы в аналитических исследованиях при работе с относительно небольшими количествами веществ, тогда как при применении этих методов для разделения относительно больших количеств белков часто возникают трудности. Определенные трудности связаны также с препартивным выделением разделенных веществ. Однако метод электрофореза обладает большой разрешающей способностью и поэтому широко используется в работах по выделению ферментов [9].

Когда фермент достаточно очищен, то в отдельных случаях удается его закристаллизовать. Кристаллизацию ферментов часто проводят из растворов сульфата аммония. Обычный метод состоит в добавлении соли к достаточно концентрированному раствору фермента до появления слабого помутнения. Затем раствор оставляют стоять. При этом постепенно (очень медленно) повышают концентрацию соли. Кристаллизация обычно облегчается, если одной из предшествующих стадий было фракционирование органическим растворителем. Это явление, вероятно, связано с удалением какого-то мешающего кристаллизации материала липидной природы [9, 10].

Последовательность этих приемов фракционирования определяют экспериментальным путем, но в общем можно сказать, что более быстрая очистка достигается сменой различных методов фракционирования, а не повторением однотипных операций.

Известно, что на активность ферментного препарата непосредственное влияние оказывает состав буфера экстрагента, грамотный подбор которого является первым этапом очистки ферментов. Поэтому задачей практической части нашего исследования являлось изучение влияния природы экстрагентов на активность препаратов пероксидазы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлась пероксидаза корнеплодов редьки черной. Для получения экстракта растительное сырье подвергли очистке стандартным методом [12] и измельчали на пластмассовой терке. Следует также отметить, что большинство ферментов локализовано внутри растительных клеток. Поэтому для нарушения целостности клеточных стенок измельченную массу дополнитель но растирали со стеклянным порошком.

В работе были использованы наиболее часто встречающиеся в литературе экстрагенты: ацетатный буфер ($\text{pH}=5,75$) фосфатный буфер ($\text{pH}=6,78$) боратный буфер ($\text{pH}=9$), 0,5 М раствор хлорида натрия NaCl [4–7, 13]. Определение средней пероксидазной активности ферментного препарата проводили в системе (I) (табл. 1) фотоколориметрическим методом согласно методике Вильштетера [12] на фотоэлектроколориметре KF-77, $l=2\text{cm}$, $\lambda=400\text{nm}$). Оксидазную активность ферментных препаратов устанавливали по аналогичной методике в системе (II) без введения пероксида водорода. За единицу активности принимали количество

окисленного субстрата (мкМ), катализированное 1 мл ферментного препарата в течение 1 мин.

$$\text{Активность рассчитывали по формуле: } A = \frac{C \cdot V_c}{V_\phi \cdot \tau}$$

где: τ – время, с;

V_ϕ – объем фермента в исследуемой системе, мл;

V_c – общий объем исследуемой системы, л;

C – концентрация пурпурогаллина, мкМ/л.

Таблица 1
Состав исследуемых систем при определении катализической активности ферментного препарата

Система (I)	Система (II)
3 мл 3% раствора H_2O_2 ;	–
3 мл 1% раствора $C_6H_3(OH)_3$	3 мл 1% раствора $C_6H_3(OH)_3$
Ферментный препарат*	Ферментный препарат*
H_2O^{**}	H_2O^{**}

Примечание:

* Объем фермента варьировался от 0,5 до 2 мл.

** Общий объем системы доводили дистиллированной водой до 10 мл.

Количество белка в экстрактах фермента определяли фотоколориметрически биуретовым методом ($l=5\text{мм}$, $\lambda=540\text{ нм}$) [14].

Контроль pH и Eh в экстрактах ферментов проводили методом прямой потенциометрии. В качестве индикаторных электродов для измерения pH использовали стеклянный электрод, для Eh – платиновый шариковый; Электрод сравнения – хлорсеребряный. Все замеры проводили в свежевыделенном ферментном препарате сразу после центрифугирования.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные в результате проведения эксперимента данные представлены в таблице 2. Необходимо отметить, что интервал pH экстрагентов соответствует ранее установленным значениям кислотности среды, соответствующих максимуму оксидазной и пероксидазной активности ферментного препарата редьки черной [15]. Из приведенных в таблице данных следует, что максимальной пероксидазной активностью обладает ферментный препарат, экстрагированный щелочным боратным буфером, а минимальной – наиболее кислым ацетатным буфером. В тоже время, в отношении оксидазной активности ферментных препаратов наблюдается иная картина – активность максимальна при экстракции в фосфатном буфере и минимальна – в боратном. Также было установлено, что более pH-зависимой является пероксидазная активность препарата, нежели оксидазная. Этот факт, наряду с близкими по значению данными о содержании белка в полученных препаратах, говорит о том, что pH экстрагента практически не оказывает влияние на

полноту извлечения пероксидазы из растительного материала, а резкое отличие скорости окисления пирогаллола в исследуемых системах с пероксидом водорода по-видимому связано с непосредственным влиянием кислотности среды на механизмы и кинетику разложения субстрата окислителя.

Таблица 2

Характеристики ферментных препаратов на основе различных экстрагентов

	Ацетатный буфер	Фосфатный буфер	NaCl (0,5 M)	Боратный буфер
Активность оксидазная (e.a)	4,1±0,05	4,6±0,04	3,9±0,07	3,7±0,04
Активность пероксидазная (e.a)	4,4±0,03	8,0±0,07	6,3±0,06	21±0,14
pH буфера	5,75	6,78	7,00	9,00
pH ферм. преп.	5,75	6,70	6,10	7,90
(-) Eh, В	0,83	0,83	0,50	0,72
C(белка), г/л	19±0,4	15±0,3	21±0,5	20±0,4

Контроль окислительно-восстановительного потенциала Eh во всех полученных экстрактах показал наличие восстановительной среды, что характерно для веществ, входящих в состав внутриклеточной среды растений. Однако явной корреляции между значением Eh-потенциала и активностью фермента на данном этапе работы установлено не было.

Было замечено, что экстрагированный фосфатным буфером ферментный препарат при минимальном содержании в нем белка обладает как значительной оксидазной, так и пероксидазной активностями по отношению к пирогаллолу, что свидетельствует об избирательности данного экстрагента по отношению к пероксидазе.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что не существует единой универсальной схемы получения высокоактивных препаратов растительных пероксидаз.
2. Определено, что пероксидазная активность ферментного препарата, выделенного из корнеплода редьки черной, зависит от природы экстрагента и максимальна в боратном буфере, а оксидазная – в фосфатном.
3. Показано, что pH экстрагента не оказывает влияния на полноту извлечения пероксидазы из растительного сырья, однако является фактором, регулирующим механизм и кинетику разложения пероксида водорода в ферментных системах.
4. Установлено, что фосфатный буфер обладает высокой избирательностью при экстракции пероксидазы из корневищ редьки черной.

Список літератури

1. Рогожин В.В. Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов / В.В. Рогожин. – М.: ГИАРД, 2004. – 240 с.
2. Андреева В.А. Фермент пероксидаза / В.А. Андреева – М.: Наука, 1988. – С. 54–55.
3. Regaldo, C. Biotechnological applications of peroxidases / C. Regaldo, B. E. García-Almendárez, M. A. Duarte-Vázquez. // Phytochem. Rev. – 2004. – Vol. 3, № 1–2. – P. 243–256
4. Пат. 2031946 РФ, МКИ C12N9/08. Способ получения пероксидазы / М.А. Аскарова [КЗ]., Б.Г. Мухамеджанов [КЗ]., Р.М. Кунаева [КЗ]. – № 5021066; Заявлено 08.01.1992; Опубл. 27.03.1995. Бюл. № 10 – 6 с.
5. Пат. №:2353652., РФ, МПК C12N9/02 Способ получения фермента пероксидазы из корней хрена / Д. В. Бочков (РФ), Т. Г. Толстикова (РФ), А. О. Брызгалов (РФ), М. В. Хвостов (РФ). – №2007135916/13; Заявлено 27.09.2007.; Опубл. 27.04.2009.
6. Пат. №: 2130070. РФ, МПК C12N9/08 Способ получения пероксидазы / А.А. Гусев (РФ), В.Д. Борзионов (РФ), А.С. Красоткина (РФ). – №97119125/13; Заявлено 24.11.1997.; Опубл. 10.05.1999.
7. Пат. №: 2388819. РФ, МПК C12N9/08 Способ получения пероксидазы хрена / В.И. Суровцев (РФ), В.М. Борзенков (РФ), К.В. Детушев (РФ). – №2008125459/13; Заявлено 27.12.2009.; Опубл. 10.05.2010.
8. Плакунов В.К. Основы энзимологии / В.К. Плакунов. – М.: Логос, 2001. – 128 с.
9. Диксон М. Ферменты / М. Диксон, Э. Уэбб. – Т. 1. – М.: Мир, 1982. – 389 с.
10. Скоупс Р. Методы очистки белков / Р. Скоупс. – М.: Мир, 1985. – 358 с.
11. Волова Т.Г. Биотехнология / Т.Г. Волова. – Новосибирск: СО РАН, 1999. – С. 105–111.
12. Селибер Г.Л. Большой практикум по микробиологии / Г.Л. Селибер. – М.: Мир, 1962. – 492 с.
13. Алпесева И.С. Анионные пероксидазы и их применение в биоанализе: Автoreферат. дис. канд. хим. наук: 02.00.15, 03.00.23 / МГУ им. М.В. Ломоносова.– Москва, 2007.– 28 с.
14. Бейли Д. Определение белка. Методы химии белков / Д.Бейли. – М.: Химия, 1965. – 266 с.
15. Лаврентьева И.В. Пероксидаза редьки черной – биокатализатор окисления фенолов в водных системах / И.В. Лаврентьева, О.В. Вяткина / Збірка тез доповідей III Міжнародної конференції студентів, аспірантів та молодих вчених НТУУ “КПІ”, ХТФ. – Київ. – 2010. – С. 242.

Вяткина О.В. Проблеми виділення та очищення рослинних пероксидаз / О.В. Вяткина // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2012. – Т. 25 (64), № 3. – С. 271-276.

У статті проведений аналіз існуючих методів виділення пероксидаз з рослинної сировини та їх очищення, зазначено що жоден з них не є універсальним. Наведені результати досліджень, що підтверджують вплив природи екстрагента на каталітичну активність пероксидази редьки чорної.

Ключові слова: пероксидаза, екстракція, фракціонування, редька чорна.

Vyatkina O.V. Problems of allocation and clearing plant peroxidase / O.V. Vyatkina // Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No. 3. – P. 271-276.

In the article analysis of existing plant peroxidases isolation and purification methods indicated that none of them is universal. Results of the studies confirm the influence of extractant nature on the catalytic activity of radish black peroxidase.

Keywords: peroxidase, extraction, fractionation, radish black.

Поступила в редакцию 20.09.2012 г.

УДК 547.792 +546.47

**ВЛИЯНИЕ РАЗМЕРНЫХ ФАКТОРОВ НА ФОТОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ
КОМПЛЕКСА ЦИНКА С 3-(ПИРИДИН-2-ИЛ)-5-(2-
САЛИЦИЛИДЕНИМИНОФЕНИЛ)-1Н-1,2,4-ТРИАЗОЛОМ**

Гусев А.Н.¹, Шульгин В.Ф.¹, Мешкова С.Б.²

¹*Таврический национальный университет имени В.И. Вернадского, Симферополь, Украина*

²*Физико-химический институт им. А.В. Богатского Национальной академии наук Украины, Одесса, Украина*

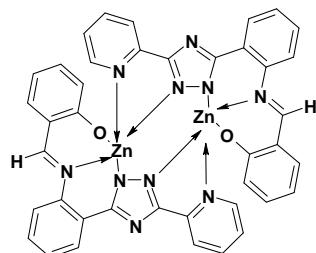
E-mail: galex0330@rambler.ru

Исследованы факторы, определяющие фотолюминесценцию комплекса цинка с 3-(пиридин-2-ил)-5-(2-салицилидениминофенил)-1Н-1,2,4-триазолом. Установлено, что фотолюминесценция исследуемого комплекса в твердом состоянии зависит от размера зерен и степени кристалличности образца. Показано, что агрегация суспензии комплекса в системе ДМСО-вода приводит к значительному увеличению интенсивности люминесценции.

Ключевые слова: фотолюминесценция, комплексы цинка, 1,2,4-триазол.

ВВЕДЕНИЕ

Дизайн и исследование новых люминофоров является актуальной задачей современной физико-неорганической химии и материаловедения что связано с их потенциальным использованием в оптоэлектронных устройствах [1–3]. В последние десятилетия наблюдается устойчивая тенденция к переходу от неорганических кристаллофосфоров и органических люминофоров к металлоорганическим люминесцентным соединениям [4, 5]. Последние имеют ряд преимуществ (яркость, чистота излучения, легкость в обработке) перед традиционными светящимися материалами, что обуславливает их активное исследование. Для решения некоторых практических задач необходимо использование люминесцентных соединений в твердом состоянии, что во многих случаях дает неудовлетворительный показатель яркости из-за концентрационного тушения. В последнее время некоторыми авторами было показано, что агрегация не всегда приводит к ослаблению свечения, а иногда усиливает его [6, 7]. Недавно мы сообщали о новом типе люминофора на основе комплекса цинка с 3-(пиридин-2-ил)-5-(2-салицилидениминофенил)-1Н-1,2,4-триазолом (комплекс Zn_2L_2) [8].



Были описаны фото- и электролюминесцентные свойства комплекса, его строение и термические свойства. В настоящей работе приведены результаты исследования влияния размерных эффектов на фотофизические свойства комплекса Zn_2L_2 .

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Рентгенофазовый анализ выполнили на приборе Дрон-ЗМ. Микрофотографии получали на растровом электронном микроскопе РЭМ-6. Регистрацию спектров люминесценции твердых образцов проводили на дифракционном спектрометре СДЛ-1 (ЛОМО) с фотоумножителем ФЭУ-62. Спектры возбуждения и люминесценции растворов исследуемых соединений записывали на приборе Fluorolog-3 с ксеноновой лампой (450 Вт).

Суспензии комплекса готовились смешиванием раствора комплекса в ДМСО с водой. В работе использовались системы с содержанием координационного соединения 0,1% по массе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Предыдущими исследованиями комплекса Zn_2L_2 было установлено, что данное соединение имеет молекулярное кристаллическое строение и не характеризуется наличием прочных межмолекулярных сил. Это создает предпосылки для легкого разрушения кристаллов и изменения способа упаковки при кристаллизации из различных растворителей. Описанные ранее кристаллы комплекса Zn_2L_2 (здесь и далее образец 1) проявляют интенсивную сине-зеленую люминесценцию ($\lambda_{\text{max}}=494$ нм) при возбуждении УФ-излучением с $\lambda=365$ нм. Дальнейшее исследование комплекса Zn_2L_2 показало, что механическое измельчение кристаллов приводит к резкому уменьшению интенсивности люминесценции, что может указывать на влияние размерных факторов на характер излучения. С целью изучения данного явления были синтезированы новые образцы комплекса цинка (образцы 2 (крупнозернистый) и 3 (мелкозернистый)) с разной степенью кристалличности и размером зерен. Спектры люминесценции образцов 1–3 представлены на рисунке 1.

Общий вид излучения для всех трех образцов одинаков, однако положение максимума в спектре изменяется от 494 нм для образца 1 до 496 нм для образца 2 и 501 нм для образца 3. Наибольшую интенсивность люминесценции имеет образец 2, напротив образец 3 практически не люминесцирует. Такая зависимость может быть связана со многими причинами – от различной структуры, до наличия примесей, тушащих люминесценцию. Данные элементного анализа и ПМР-спектроскопии

свидетельствуют о том, что образцы **1–3** имеют одинаковый состав. Порошковая рентгенограмма образца **2** содержит слегка уширенные пики, хорошо согласующиеся с модельной дифрактограммой образца **1** из данных РСТА. Полученные данные свидетельствуют о высокой степени упорядоченности структуры в образце **2**. Напротив, дифрактограмма образца **2** характеризуется наличием очень размытых пиков, указывая на природу близкую к аморфной. Различная степень кристалличности четко видна на микрофотографиях образцов **2** и **3**, приведенных на рис. 2 а, б.

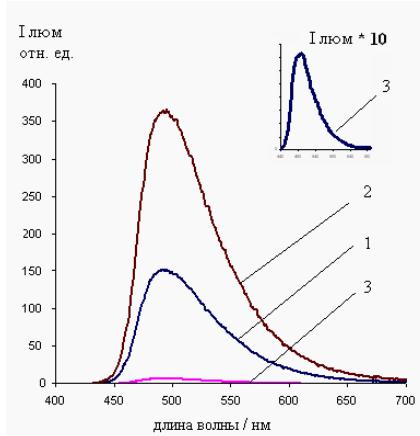


Рис. 1. Спектры люминесценции твердых образцов **1–3**.

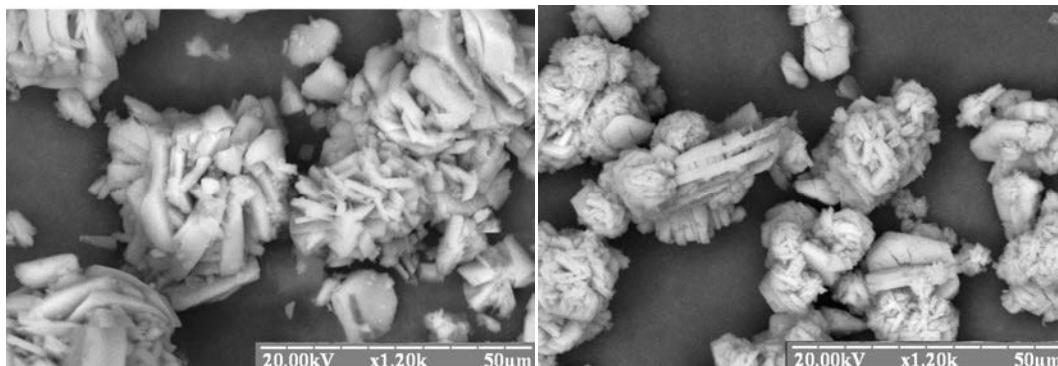


Рис.2 а. Микрофотография образца **2**

Рис.2 б. Микрофотография образца **3**.

Полученные данные подтверждают идентичность всех трех образцов и свидетельствуют о том, что различия в строении и чистота люминофора не может быть причиной различий характере люминесценции. Известно, что эффективность фотолюминесценции в твердом состоянии часто зависит от степени измельчения и однородности образца [9]. Из рисунка 2 видно, что зерна кристаллов образца **2** состоят из сростков хорошо сформированных призматических кристаллов с

близкими размерами, в то время как для образца 3 размер образующих зерна кристаллов варьируется в большом интервале – от практически аморфных фрагментов до крупнокристаллических. Очевидно, наиболее вероятной причиной, определяющей характер люминесценции комплекса Zn_2L_2 в твердом состоянии, является однородность образца и степень кристалличности.

Влияние размерных эффектов на фотолюминесцентные свойства Zn_2L_2 четко проявляется в реализации излучения, вызванного агрегацией, или AIE (*aggregation induced emission*) в смеси ДМСО-вода. Данное явление, впервые описанное в 2001 году группой под руководством проф. Танга, проявляется в отсутствии люминесценции в разбавленных растворах и увеличении интенсивности люминесценции при переходе в твердое состояние [10]. Большинство соединений, для которых было описано явление AIE, относится к органическим люминофорам, и известно лишь несколько примеров для комплексов d-металлов [9].

Поскольку комплекс Zn_2L_2 не растворим в воде и растворим в ДМСО, то добавление большого количества воды к раствору вызывает образование твердой фазы. Результаты исследования AIE представлены в табл. 1. Спектры люминесценции суспензий с различным содержанием воды представлены на рисунке 3.

Таблица 1
Положение максимума и интенсивность люминесценции суспензий комплекса Zn_2L_2 в системе ДМСО-вода.

Содержание воды, %	Интенсивность, отн. ед.	Положение максимума, нм
0	7	505
5	5,7	504
10	3,4	504
15	90	501
20	115	495
25	138	495

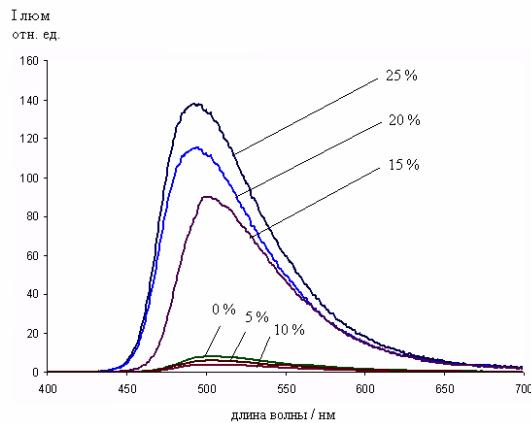


Рис. 3. Спектры люминесценции суспензий комплекса Zn_2L_2 в системе ДМСО-вода.

Раствор Zn_2L_2 в ДМСО проявляет очень слабую люминесценцию с максимумом 505 нм. Использование в качестве растворителя смеси ДМСО-вода с содержанием воды 5 и 10% по объему приводит к еще большему ослаблению люминесценции, при этом положение максимума эмиссии не изменяется. Уменьшение интенсивности излучения при добавлении первых порций воды может быть связано с образованием гидратов Zn_2L_2 и тушением люминесценции вследствие безизлучательных потерь энергии за счет колебаний OH-осцилляторов. Следует отметить, что вхождение молекул воды в кристаллическую решетку Zn_2L_2 было установлено ранее рентгеноструктурным анализом. Дальнейшее увеличение содержания воды до 15% приводит к резкому увеличению интенсивности люминесценции. Подобное поведение можно объяснить агрегацией молекул комплекса и образованием микрогетерогенной системы Zn_2L_2 -растворитель, в которой молекулы люминофора обладают меньшей подвижностью и слабее теряют энергию возбуждения. Увеличение содержание воды в растворителе до 20 и 25% приводит к дальнейшему увеличению интенсивности люминесценции. Попытки получить устойчивую суспензию в среде с содержанием воды выше 25% не удалось вследствие быстрой агрегации и седиментации суспензии.

ВЫВОД

Исследована серия образцов цинкового комплекса с функциализированным 1,2,4-триазолом в виде суспензий и твердом состоянии. Проанализировано влияние агрегационных явлений на фотолюминесценцию комплекса Zn_2L_2 . Полученные данные позволяют оптимизировать синтез и условия эксплуатации люминофоров.

Список литературы

1. Binnemans K. Lanthanide-Based Luminescent Hybrid Materials / K. Binnemans // Chem. Rev. -2009. – Vol. 109. – P. 4283–4374.
2. Akcelrud L. Electroluminescent polymers / L. Akcelrud // Prog. Polym. Sci. – 2003. – Vol. 28. – P. 875–962.
3. Wang S. Luminescence and electroluminescence of Al(III), B(III), Be(II) and Zn(II) complexes with nitrogen donors / S. Wang // Coordination Chemistry Reviews. – 2001 . – Vol. 215. – P. 79–98.
4. Ho C. Metal-containing polymers: Facile tuning of photophysical traits and emerging applications in organic electronics and photonics / C.-L. Ho, W.-Y. Wong // Coord. Chem. Rev. – 2011. – Vol. 255. – P. 2469–2502.
5. Kuz'mina N. P. Photo and Electroluminescence of Lanthanide(III) Complexes / N. P. Kuz'mina and S. V. Eliseeva // Russ. J. of Inorg. Chem. – 2006. – Vol. 51, No. 1. – P. 73–88
6. Hong Y. Aggregation-induced emission / Y. Hong, J. W. Y. Lamab, B. Z. Tang // Chem. Soc. Rev. - 2011. – Vol. 40. – P. 5361–5388
7. Parmar C. K. Aggregation of azamethine dyes on hydrated glass surfaces: An evanescent wave-induced fluorescence study / C. K. Parmar, G. R. Christopher, J. Winscom // Phys. Chem. Chem. Phys. – 2002 – Vol. 4. – P. 1766–1775.
8. Gusev A. N. New Zn complexes based on 1,2,4-triazoles: synthesis, structure and luminescence / A. N Gusev, V. F. Shul'gin, O.V. Konnic, et. al // Inorg. Chem Acta. – 2011. – Vol. 379. – P. 509–514
9. Shan G.-G. Piezochromic luminescent (PCL) behavior and aggregation-induced emission (AIE) property of a new cationic iridium(III) complex. / G.-G. Shan, H.-B. Li, J.-S. Qin, D.-X. Zhu, Y. Liao and Z.-M. Su. // Dalton Trans., 2012. – Vol. 41. – P. 9590–9593

10. Luo J. D. Aggregation-induced emission of 1-methyl-1,2,3,4,5-pentaphenylsilole / J. D. Luo, Z. L. Xie, J. W. Y. Lam, L. Cheng, H. Y. Chen, C. F. Qiu, H. S. Kwok, X. W. Zhan, Y. Q. Liu, D. B. Zhu and B. Z. Tang. // Chem. Commun. – 2001. – P. 1740–1741.

Гусев О.М. Вплив розмірних факторів на фотолюмінісценцію комплексу цинку з 3-(піridин-2-іл)-5-(2-саліциліденімінофеніл)-1Н-1,2,4-триазолом / О.М. Гусев, В.Ф. Шульгин, С.Б. Мешкова // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2012. – Т. 25 (64), № 3. – С. 277-282.

Досліджено фактори, що обумовлюють фотолюмінісценцію комплексу цинку з 3-(піridин-2-іл)-5-(2-саліциліденімінофеніл)-1Н-1,2,4-триазолом. Встановлено, що фотолюмінісценція досліджуваного комплексу у твердому стані залежить від розміру зерен та ступені кристалічності образків. Показано, що агрегація суспензії комплексу у системі ДМСО-вода призводить до значного підвищення інтенсивності люмінесценції.

Ключові слова: фотолюмінісценція, комплекси цинку, 1,2,4-триазол.

Gusev A.N. The influence of size factors on the photoluminescence of zinc complex with 3-(pyridin-2-yl) – 5-(2-salycilideniminophenyl)-1H-1,2,4-triazole. / A.N. Gusev, V.F. Shul'gin, S.B. Meshkova // Scientific Notes of Taurida V. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No. 3. – P. 277-282.

The factors determining the photoluminescence of zinc complex with 3-(pyridin-2-yl) – 5-(2-salycilideniminophenyl)-1H-1,2,4-triazole. It was found that the photoluminescence of the complex in the solid state depends on the grain size and the degree of crystallinity of the sample. It was shown that the aggregation of the suspension of the complex in DMSO-water leads to a significant increase in the intensity of luminescence.

Keywords: photoluminescence, zinc complexes, 1,2,4-triazole.

Поступила в редакцію 25.09.2012 г.

УДК 543.257:681.142.2

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕКОТОРЫХ МЕТОДОВ ОЦЕНКИ
ВОСПРОИЗВОДИМОСТИ ПАРАМЕТРОВ КРИВОЙ
КОМПЛЕКСИМЕТРИЧЕСКОГО ТИТРОВАНИЯ**

Кропотов В.А.

*Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Украина
E-mail: v.kropotov@crimea.edu*

Проведен сравнительный анализ четырех методов оценки воспроизводимости параметров кривой комплексиметрического титрования: по повторным титрованиям, из суммы квадратов отклонений и двух способов, базирующихся на "законе распространения погрешностей". Установлено, что в большинстве титрований все методы дают в целом неплохо согласующиеся между собой результаты. При оценке прецизионности результатов по единственному титрованию в общем случае преимущество имеют методы, основанные на "законе распространения погрешностей".

Ключевые слова: потенциометрическое титрование, прогнозирование погрешностей, комплексиметрическое титрование.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время для оценки воспроизводимости параметров кривой потенциометрического титрования, получаемых методом наименьших квадратов (МНК), в основном применяют повторные эксперименты (титрования) и сумму квадратов отклонений [1, 2].

Повторные эксперименты, согласно [1], являются самым надежным способом оценивания воспроизводимости рассчитываемых величин. В случае титрования они позволяет учесть случайные погрешности, возникающие на всех повторяющихся этапах титрования, включая отбор пробы. Вместе с тем этот метод требует выполнения большого числа (не менее 20) повторных титрований, в то время как их число обычно не превышает 3 – 5. Как следствие, найденные оценки воспроизводимости параметров могут быть не достаточно надежными.

Метод [2], основанный на использовании суммы квадратов отклонений, позволяет получить оценку воспроизводимости параметров из единственного эксперимента. Он учитывает только случайные погрешности, возникающие на этапе добавления титранта, и чувствителен к неадекватности регрессионной модели. При оценке параметров нелинейных зависимостей для него характерна низкая воспроизводимость суммы квадратов отклонений и, как следствие, дисперсий параметров в повторных экспериментах [1].

К другим методам, позволяющим оценить дисперсии параметров кривой по единственному титрованию, относятся методы [3, 4], базирующиеся на "законе

распространения погрешностей". В них предполагается, что дисперсии измеряемых величин заранее известны. Их особенностью является малая чувствительность к неадекватности модели титрования.

В методе [3] для оценки дисперсий параметров кривой потенциометрического титрования решают систему линейных уравнений

$$\begin{aligned} A_{11}\sigma_{U_1}^2 + A_{12}\sigma_{U_2}^2 + \dots + A_{1m}\sigma_{U_m}^2 &= (\sigma'_{U_1})^2, \\ A_{21}\sigma_{U_1}^2 + A_{22}\sigma_{U_2}^2 + \dots + A_{2m}\sigma_{U_m}^2 &= (\sigma'_{U_2})^2, \\ \vdots & \quad (1) \\ A_{m1}\sigma_{U_1}^2 + A_{m2}\sigma_{U_2}^2 + \dots + A_{mm}\sigma_{U_m}^2 &= (\sigma'_{U_m})^2, \end{aligned}$$

где $\sigma_{U_i}^2$ – дисперсия параметра U_i ($i = 1, 2, \dots, m$, m – число искомых параметров); $(\sigma'_{U_i})^2$ – дисперсия, характеризующая прямое воздействие погрешностей измерения на параметр U_i . Коэффициенты A_{ij} учитывают корреляцию параметров кривой титрования и рассчитываются из аналитических выражений для частных производных модельной функции по искомым параметрам.

В основе метода [4] лежит выражение

$$\sigma_{U_i}^2 = (k_E^{U_i} \sigma_E)^2 + (k_V^{U_i} \sigma_V)^2, \quad (2)$$

где σ_E^2 и σ_V^2 – дисперсии, характеризующие соответственно случайные погрешности измерения потенциала (или рХ) и добавленного объема титранта (предполагается, что обе случайные погрешности независимы, а соответствующие дисперсии постоянны). Значения коэффициентов $k_E^{U_i}$ и $k_V^{U_i}$ находят из рассчитываемых численно кажущихся частных производных параметров по потенциалу (или рХ) и объему титранта. Недостаток этого метода заключается в том, что он требует выполнения $2n$ дополнительных определений параметров и, что более важно, подбора шага для численного дифференцирования для конкретных условий титрования.

Учитывая, что описанные выше схемы оценки прецизионности параметров кривой титрования различаются, они могут давать отличающиеся результаты. В связи с этим целесообразно сравнить особенности данных методов в различных типах титрования.

В данной статье приводятся результаты сравнительного анализа воспроизводимости оценок параметров потенциометрического комплексиметрического титрования, полученные представленными выше методами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Кривые потенциометрического комплексиметрического титрования 1:1 с заранее известными характеристиками получали по методу Монте-Карло.

Первоначально заданные номинальные объемы титранта суммировали с нормально распределенными погрешностями его дозирования ($\sigma_V=0,001$ мл). Затем, для каждого полученного таким образом объема титранта рассчитывали

соответствующее значение рМ раствора и прибавляли к нему нормально распределенную погрешность измерения рМ ($\sigma_{\text{рM}}=0,001$ ед. рМ). После этого восстанавливали исходные значения добавленного объема титранта. Основные расчеты проводили со следующими сгенерированными кривыми титрования:

1. (5:1:5) – $V=0,30, 0,90, 1,50, 2,10, 2,40, 2,50, 2,60, 3,10, 3,70, 4,30, 4,90$ мл;
2. (10:1:10) – $V=0,30, 0,60, 0,90, 1,20, 1,50, 1,80, 2,10, 2,30, 2,40, 2,45, 2,50, 2,55, 2,60, 2,80, 3,10, 3,40, 3,70, 4,00, 4,30, 4,60, 4,90$ мл;
3. (19:1:20) – $V=0,15, 0,30, 0,45, 0,60, 0,75, 0,90, 1,05, 1,20, 1,35, 1,50, 1,65, 1,80, 1,95, 2,10, 2,20, 2,30, 2,35, 2,40, 2,45, 2,50, 2,55, 2,60, 2,65, 2,70, 2,80, 2,85, 2,95, 3,10, 3,25, 3,40, 3,55, 3,70, 3,85, 4,00, 4,15, 4,30, 4,45, 4,60, 4,75, 4,90$ мл.

Концентрацию титруемого металла варьировали от 5×10^{-4} М до 5×10^{-3} М. Исходный объем титруемого раствора и объем точки эквивалентности во всех титрованиях были соответственно равны 50 мл и 2,5 мл.

Обработку сгенерированных кривых титрования проводили с помощью логарифмических зависимостей

$$\text{рM} = L_1 = a_1 + b_1 \lg \left[\frac{c_t(V_e - V)}{V_0 + V} + x_1 \right] \text{ для } V < V_e \text{ и}$$

$$\text{рM} = L_2 = a_2 + b_2 \lg \left[\frac{c_t(V - V_e)}{V_0 + V} + x_2 \right] \text{ для } V \geq V_e,$$

где $a_1 = \text{рM}^0$; $a_2 = \text{рM}^0 + b_2 \text{рK}$; рM^0 – значение рМ, соответствующее $[\text{M}]=1$ М; b_i – постоянные коэффициенты (в рМ-метрическом титровании $|b_1|=|b_2|=1$); V_0 – начальный объем титруемого раствора; V_e – объем титранта, соответствующий точке эквивалентности; c_t – концентрация титранта; x_i – поправки на обратимость реакции титрования

Оценку параметров a_1 , a_2 и V_e получали минимизацией суммы квадратов отклонений методом Гаусса-Ньютона [5].

Значение lgK рассчитывали по формуле

$$\text{lgK} = \frac{a_2 - a_1}{b_1}.$$

Более подробные сведения по обработке кривых комплексиметрического титрования с помощью логарифмических зависимостей и выражения для частных производных приведены в статье [6].

Оценки стандартных отклонений параметров кривой титрования находили четырьмя способами:

1. из 20 повторных титрований;
2. из суммы квадратов отклонений;
3. решением системы уравнений (1);
4. из кажущихся частных производных (уравнение (2)).

При численном дифференцировании, как правило, применяли разности вперед. В отдельных случаях применяли также и центральные разности. Предварительно

было установлено, что наиболее подходящим для всех титрований является шаг дифференцирования, равный 1,5 стандартным отклонениям σ_E и σ_V . Принцип численного нахождения частных производных в потенциометрическом титровании дан в [4].

Дисперсию $\lg K$ в трех последних случаях рассчитывали по формуле:

$$\sigma_{\lg K}^2 = \frac{\sigma_{a_1}^2 + \sigma_{a_2}^2 - 2r_{a_1, a_2}\sigma_{a_1}\sigma_{a_2}}{b_1^2},$$

где $r_{a1, a2}$ – коэффициент корреляции a_1 и a_2 .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Некоторые типичные результаты исследования представлены в таблицах 1 – 3. Они относятся к титрованиям, наиболее близким к натурному эксперименту ($\sigma_v=0,001$ мл, $\sigma_{pm}=0,001$ ед. pm).

В таблице 1 приведены отношения f максимальной и минимальной оценок дисперсий параметров в пределах каждого метода их вычисления (в круглых скобках в этой и других таблицах приведены значения, полученные из центральных разностей).

Таблица 1
Отношение F максимальной и минимальной дисперсий параметров для некоторых титрований ($\sigma_v=0,001$ мл, $\sigma_{pm}=0,001$ ед. pm, $c_M=5\times10^{-4}$ М)

Кривая	$\lg K=6$		$\lg K=10$		$\lg K=16$	
	$\lg K$	V_e	$\lg K$	V_e	$\lg K$	V_e
Из остаточной суммы квадратов^a						
5:1:5	6,4	6,3	8,4	8,4	17	17
10:1:10	3,3	3,3	2,4	2,4	5,1	5,0
19:1:20	2,1	2,1	2,5	2,5	2,3	2,3
Из повторных титрований^b						
5:1:5	3,8	2,0	2,1	2,5	2,6	2,6
10:1:10	1,7	1,5	2,3	2,3	1,8	4,0
19:1:20	1,7	2,4	1,9	4,3	3,1	2,4
Из системы линейных уравнений^a						
5:1:5	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
10:1:10	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
19:1:20	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Из кажущихся производных^a						
5:1:5	1,0	1,0	1,4	1,70	15	21
10:1:10	1,0	1,5	1,7	3,5	17	19 (9,8)
19:1:20	1,3	1,1	1,2	1,6	236	435

а) найдены из 20 повторных титрований, б) найдены из 4 серий по 20 титрований

Из таблицы 1 видно, что наиболее стабильные результаты дает система уравнений (1). Затем следуют повторные титрования. Дисперсии, рассчитываемые из кажущихся производных, при небольших константах титрования ($\lg K < 12$) также неплохо воспроизводятся от титрования к титрованию. Однако при $\lg K \geq 12$ их воспроизводимость резко ухудшается, причем, чем больше точек на кривой титрования и больше концентрация, тем хуже воспроизводимость дисперсий. Применение вместо разностей вперед центральных разностей (см. в круглых скобках) несколько уменьшает разброс дисперсий, но, тем не менее, он остается значительным. Все это свидетельствует о сильной нелинейности зависимости $U_i = f(E, V)$ при $\lg K \geq 12$.

Дисперсии параметров, рассчитываемые из суммы квадратов отклонений, если исключить титрования с $\lg K \geq 12$, во всем исследованном интервале концентраций и значений констант равновесия имеют наихудшую воспроизводимость, что согласуется с [1].

Проверку однородности дисперсий параметров, полученных из остаточной суммы квадратов и повторных титрований в пределах каждого метода, проводили с помощью критерия Бартлетта [7]. Полученные результаты приведены в таблице 2. В ней отсутствуют сведения для дисперсий, рассчитываемых по уравнениям (1) и (2) (для них число степеней свободы формально равно ∞ , что исключает применение критерия Бартлетта).

Таблица 2
Значения коэффициентов В (критерий Бартлетта) для некоторых титрований
 $(\sigma_V=0,001 \text{ мл}, \sigma_{pM}=0,001 \text{ ед. } pM, c_M=5 \times 10^{-4} \text{ М})$

Кривая	pK=6		pK=10		pK=16		Статистический критерий
	lgK	V_e	lgK	V_e	lgK	V_e	
Для остаточной суммы квадратов							
5:1:5	12,3	12,1	18,0	18,0	22,7	22,7	$\chi^2_{0.95}(19)=30,1$
10:1:10	24,7	24,6	21,9	21,9	25,3	25,3	
19:1:20	17,1	17,1	21,4	18,2	15,3	15,4	
Для повторных титрований							
5:1:5	8,33	4,79	2,56	4,72	4,45	4,18	$\chi^2_{0.95}(3)=7,81$
10:1:10	3,99	5,35	0,28	1,85	6,15	3,91	
19:1:20	1,44	3,65	2,71	9,97	7,27	4,13	

Согласно таблице 2, оценки дисперсий параметров, полученные из суммы квадратов отклонений, являются однородными.

Гипотезу об однородности оценок дисперсий параметров, рассчитываемых по повторным титрованиям, иногда приходится отвергать, хотя в силу идентичности всех повторных титрований все дисперсии в пределах каждого метода их оценивания являются однородными. Следует отметить, что критерий Бартлетта очень чувствителен к отклонениям исходных данных от нормальности. Поэтому иногда гипотезу об однородности дисперсий приходится отвергать не из-за

неоднородности дисперсии, а из-за небольших отклонений выборки от нормального распределения [7].

Типичные значения стандартных отклонений параметров, полученные разными методами, приведены в таблице 3: s – из повторных титрований, r – из суммы квадратов отклонений, σ' – из системы уравнений (1) и σ'' – из кажущихся производных (уравнение (2)). В последнем случае в круглых скобках приведены значения, полученные из центральных разностей. Все величины в таблице 3 относятся к титрованиям 10:1:10, так как примерно такое число точек содержат реальные кривые титрования. В ней также даны отношения F максимальной и минимальной сводных дисперсий, полученных разными методами.

Таблица 3
Значения стандартных отклонений параметров, полученных разными способами, и отношения F максимальной и минимальной дисперсий параметров (кривые 10:1:10, $\sigma_V=0,001$ мл, $\sigma_{pM}=0,001$ ед. рМ, $c_M=5\times10^{-4}$ М)

lgK	$s \times 10^4$	$r \times 10^4$	$\sigma' \times 10^4$	$\sigma'' \times 10^4$	F	Критическое $F_{0.95}$
Для lgK						
6	5,8	<u>6,3</u>	<u>5,7</u>	5,8	1,22	$F(360, \infty) = 1,13$
8	<u>5,6</u>	<u>6,2</u>	5,6	5,7	1,21	$F(360, 76) = 1,37$
10	5,8	<u>5,8</u>	<u>5,6</u>	5,9	1,09	$F(360, \infty) = 1,13$
12	<u>5,1</u>	<u>6,0</u>	5,6	6,8 (5,4)	1,38	$F(360, 76) = 1,37$
16	5,8	<u>6,1</u>	<u>5,6</u>	8,5 (6,1)	1,17	$F(360, \infty) = 1,13$
Для Ve						
6	<u>6,1</u>	6,1	<u>5,1</u>	5,7	1,46	$F(76, \infty) = 1,28$
8	<u>3,9</u>	<u>4,6</u>	4,0	4,2	1,39	$F(360, 76) = 1,37$
10	<u>4,1</u>	4,3	4,0	<u>4,5</u>	1,21	$F(\infty, 76) = 1,34$
12	<u>3,7</u>	<u>4,4</u>	4,0	6,4 (5,3)	1,41	$F(360, 76) = 1,37$
16	<u>3,9</u>	<u>4,5</u>	4,0	7,2 (6,3)	1,33	$F(360, 76) = 1,37$

Примечание: стандартные отклонения, отвечающие сравниваемым дисперсиям, в таблице выделены подчеркиванием; значения F , превышающие критические, выделены жирным шрифтом.

Из таблицы 3 следует, что, согласно критерию Фишера, гипотезу об однородности сводных дисперсий параметров, полученных разными методами, примерно в 50% случаев можно признать согласующейся с опытом. В тех случаях, когда её приходится отвергать, экспериментальные отношения F не намного (не более 15%) превышают соответствующие критические значения. Следует отметить, что для титрований с $lgK \geq 12$ стандартные отклонения параметров, найденные из кажущихся производных, почти всегда в той или иной степени завышены (в таблице

З они приведены курсивом). Применение центральных разностей вместо разностей вперед несколько улучшает ситуацию, но не полностью.

Было установлено, что сильная нелинейность зависимостей $U_i=f(E, V)$ при $\lg K \geq 12$ обусловлена наличием точки(ек) в непосредственной близости от конечной точки титрования. Удаление этих точек при обработке данных делает зависимости $U_i=f(E, V)$ близкими к линейным. Как следствие, стандартные отклонения, получаемые из кажущихся производных, не сильно отличаются от аналогичных величин, найденных другими методами (см. таблицу 4). При этом не имеет значения, какие разности, вперед или центральные, применяли для расчета кажущихся производных.

Таблица 4

Значения стандартных отклонений параметров, полученных разными способами (кривые 10:10, $\lg K = 16$, $\sigma_V = 0,001$ мл, $\sigma_{pM} = 0,001$ ед. рМ, $c_M = 5 \times 10^{-4}$ М)

$s \times 10^4$	$r \times 10^4$	$\sigma \times 10^4$	$\sigma' \times 10^4$
Для $\lg K$			
6,1	6,5	5,6	5,7 (5,7)
Для V_e			
5,1	5,3	4,3	4,6 (4,6)

Таким образом, при обработке единичных титрований наиболее стабильные и надежные результаты в общем случае дает система уравнений (1). Вместе с тем необходимо учитывать, что иногда (сильно разбавленные растворы и/или малая константа титрования) система уравнений (1) может быть плохо обусловленной (определитель близок к нулю). Вследствие этого решение системы уравнений (1) может быть либо к неверным, либо вообще не иметь физического смысла.

Оценка прецизионности параметров с использованием кажущихся производных с учетом сказанного выше также дает неплохие результаты. Этот метод особенно удобен тогда, когда в регрессионном анализе не применяются аналитические выражения для производных (например, в методе Пауэлла). Кроме того, при обработке кривых титрования с очень малым скачком, он в является альтернативой уравнениям (1).

Повторные титрования следует проводить в тех случаях, когда влияние случайных погрешностей, возникающих на этапах, предшествующих собственно титрованию, на результаты титрования сопоставимо с влиянием случайных погрешностей измерения потенциала (или рХ) дозирования объема титранта. Но и тогда их можно не проводить, если на всех этапах совокупного аналитического процесса доминируют инструментальные погрешности, которые можно учесть градуировкой измерительной аппаратуры и применением "закона распространения погрешностей".

ВЫВОД

Проведен сравнительный анализ четырех методов оценки воспроизводимости параметров кривой комплексиметрического титрования: по повторным титрованиям, из суммы квадратов отклонений и двух способов, базирующихся на "законе распространения погрешностей". Установлено, что в большинстве

титрований все методы дают в целом неплохо согласующиеся между собой результаты. При оценке прецизионности результатов по единственному титрованию в общем случае преимущество имеют методы, основанные на "законе распространения погрешностей"

Список литературы

1. Бард Й. Нелинейное оценивание параметров. / Бард Й. – М.: Мир, 1979. – 349 с.
2. Бородин В.А. Пакет универсальных программ для обработки экспериментальных данных при изучении сложных равновесий в растворах. В кн.: Математические задачи химической термодинамики. / В.А. Бородин, В.П. Васильев, Е.В. Козловский – М.: Новосибирск. Наука. 1985. – С. 219-226.
3. Кропотов В.А. Прогнозирование случайных погрешностей параметров кривой потенциометрического титрования: теоретический аспект / В.А. Кропотов // Ученые записки ТНУ. Биология, химия. – 2006. – Т. 19 (58). № 2. – С. 104-110.
4. Metes L. Factors affecting the precision of a new method for determining the reduced and oxidized forms of a redox couple by a single potentiometric titration / L. Metes, N. Fanelli // Anal. Chim. Acta. – 1987. – Vol. 194. – P. 151–162.
5. Химмельбау Д. Прикладное нелинейное программирование. / Химмельбау Д. – М.: Мир, 1975. – 534 с.
6. Кропотов В.А. Апроксимация кривых комплексонометрического и седиметрического титрования логарифмическими зависимостями / В.А. Кропотов // Журн. аналит. химии. – 1998. – Т.53. № 6. – С. 566-570.
7. Большев Л.Н. Таблицы математической статистики. / Л.Н. Большев, Н.В. Смирнов – М.: ВЦ АН СССР, 1968. – 476 с.

Кропотов В.А. Порівняльна характеристика деяких методів оцінки відтворюваності параметрів кривої комплексиметричного титрування / В.А. Кропотов // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2012. – Т. 25(64), № 3. – С. 283-290. Проведено порівняльний аналіз чотирьох методів оцінки відтворюваності параметрів кривої комплексиметричного титрування: по повторних титруваннях, із суми квадратів відхилень і двох способів, що базуються на "законі поширення похібок". Установлене, що в більшості титрувань усі методи дають результати, що у цілому непогано погодяться між собою. При оцінці прецизійності результатів по єдиному титруванню в загальному випадку перевагу мають методи, засновані на "законі поширення похібок".

Ключові слова: потенціометричне титрування, прогнозування похібок, комплексиметричне титрування.

Kropotov V.A. Comparative characteristics of some methods for the reproducibility estimation of compleximetric titration curve parameters / V.A. Kropotov // Scientific Notes of Taurida V. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No. 3. – P. 283-290.

The paper deals with the comparison of four methods of reproducibility estimation of compleximetric titration curve parameters (the repeated titration method, the sum of squares of deviations and two methods according to "the law of distribution of errors"). It is established that all methods as a whole give reproducibility estimations of a titration curve parameters correlating well in the majority of titrations. At unique titration generally the methods based on "the law of distribution of errors" have advantage.

Keywords: potentiometric titration, error prediction, compleximetric titration.

Поступила в редакцию 24.09.2012 г.

УДК 547.918:547.587.11:543.42

**ЭЛЕКТРОСПРЕЙ-ИОНИЗАЦИОННАЯ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ СМЕСЕЙ
ТРИТЕРПЕНОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ С АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТОЙ
(АСПИРИНОМ)**

**Лекарь А.В.¹, Яковшин Л.А.², Борисенко С.Н.¹, Ветрова Е.В.¹, Борисенко Н.И.³,
Гришковец В.И.⁴**

¹*НИИ физической и органической химии Южного федерального университета,
Ростов-на-Дону, Россия*

²*Севастопольский национальный технический университет, Севастополь, Украина*

³*Эколого-аналитический центр Южного федерального университета, Ростов-на-Дону,
Россия*

⁴*Таврический национальный университет имени В.И. Вернадского, Симферополь, Украина
E-mail: chemsevntu@rambler.ru*

Методом масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением впервые исследовано комплексообразование ацетилсалициловой кислоты (аспирин) с тритерпеновыми гликозидами α -хедерином (3- O - α -L-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 2)- O - α -L-арабинопиранозидом хедерагенина) и хедерасапонином С (3- O - α -L-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 2)- O - α -L-арабинопиранозил-28- O - α -L-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 4)- O - β -D-глюкопиранозил-(1 \rightarrow 6)- O - β -D-глюкопиранозидом хедерагенина), выделенными из плюща. Гликозиды образуют с ацетилсалициловой кислотой молекулярные комплексы состава 1:1. Комплекс ацетилсалициловой кислоты с α -хедерином более устойчив.

Ключевые слова: масс-спектрометрия с ионизацией электрораспылением, тритерпеновые гликозиды, α -хедерин, хедерасапонин С, ацетилсалициловая кислота (аспирин), молекулярный комплекс.

ВВЕДЕНИЕ

Ацетилсалициловая кислота (аспирин, AcSal, рис. 1) является ненаркотическим анальгетиком-антипириетиком и нестероидным противовоспалительным средством. Из-за обладания противовоспалительной, жаропонижающей и обезболивающей активностью ее часто назначают при лихорадках, головной боли, невралгиях и ревматизме. AcSal проявляет антиагрегационное действие, поэтому находит применение при нарушениях мозгового кровообращения и для профилактики тромбозов. Однако AcSal может вызвать аллергические реакции, поражение слизистой желудка и двенадцатиперстной кишки, желудочные кровотечения и нарушение эмбрионального развития [1].

Известно, что побочные эффекты и терапевтические дозы лекарственных веществ можно существенно снижать за счет молекулярного комплексообразования со стероидными и тритерпеновыми сапонинами [2]. Комплексы гликозидов с различными биологически активными веществами обычно получают путем

инкубирования смесей их водных растворов или растворов с добавкой спирта или ацетона с последующим упариванием [3–7]. Образующиеся комплексы анализируют различными спектральными методами. В частности, для исследования молекулярных комплексов стероидных гликозидов с аминокислотами [4, 8–11], нуклеозидами и аденоzin-5'-монофосфатом [10–12] использовали метод масс-спектрометрии.

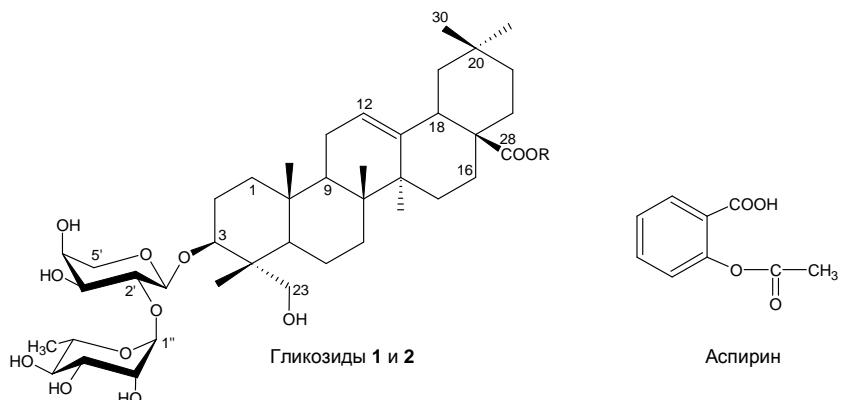


Рис. 1. Строение аспирина и тритерпеновых гликозидов **1** (R=H) и **2** (R=←βGlc_p-(6→1)-βGlc_p-(4→1)-αRha_p).

С целью снижения побочных эффектов AcSal были получены в водно-спиртовой среде ее комплексы с глицирризиновой кислотой, являющейся главным тритерпеновым сапонином различных видов солодки *Glycyrrhiza* L. [3, 13, 14]. Комплексы оказались менее токсичными и ульцерогенными, а также обладали большей широтой противовоспалительного действия по сравнению с индивидуальной AcSal [3, 5, 14, 15]. Комплексообразование было подтверждено ИК-спектроскопически [3].

Начато систематическое исследование комплексообразования α -хедерина (3-*O*- α -*L*-рамнопиранозил-(1→2)-*O*- α -*L*-арабинопиранозида хедерагенина, гликозид **1**, рис. 1) и хедерасапонина С (3-*O*- α -*L*-рамнопиранозил-(1→2)-*O*- α -*L*-арабинопиранозил-28-*O*- α -*L*-рамнопиранозил-(1→4)-*O*- β -*D*-глюкопиранозил-(1→6)-*O*- β -*D*-глюкопиранозида хедерагенина, гликозид **2**, рис. 1) [16]. Гликозиды **1** и **2** являются одними из самых распространенных тритерпеновых гликозидов растений семейства аралиевых (Araliaceae Juss.). Они входят в состав препаратов для лечения кашля, содержащих экстракт листьев плюща обыкновенного *Hedera helix* L. [17].

Недавно были получены молекулярные комплексы гликозидов **1** и **2** с AcSal. Комплексообразование между ними рассмотрено методом ИК-спектроскопии [18]. При этом состав комплексов не был установлен. Комплексы гликозидов **1** и **2** с AcSal, полученные в тех же самых условиях, ранее методом масс-спектрометрии не изучались. Настоящая статья посвящена использованию масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением для изучения процессов комплексообразования тритерпеновых гликозидов **1** и **2** с AcSal.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Тriterпеновые гликозиды **1** и **2** выделяли из листьев плющей крымского *Hedera taurica* Carr. и канарского *Hedera canariensis* Willd. (Araliaceae Juss.). Методики выделения и установления строения приведены в работах [19, 20].

Комплекс **1** получали путем смешивания растворов, содержащих по 1 ммоль гликозида и 1 ммоль AcSal, а гликозида **2** – в молярном соотношении 1:2 соответственно (растворитель – смесь 70%-ного водного раствора C_2H_5OH и $CHCl_3$ в соотношении 3:1 по объему). Полученную смесь выдерживали при 40 °C 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 micrOTOFcontrolTM2.2. 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 ± 4200 В, параметры газа-осушителя (азот квалификации “осч”, 5 л/мин, 200 °C) оптимизированы для детектирования пиков ионов ассоциатов. Для прямого ввода использованы растворы веществ в ацетонитриле (фирма Merck, квалификация HPLC/MS) в концентрации до 0.2 мг/мл (10^{-7} – 10^{-6} М). Соотношения m/z и относительные интенсивности пиков ионов ($I_{\text{отн.}}$, %) приведены в табл. 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В масс-спектре AcSal в режиме положительных ионов зафиксированы пики катионизированных молекул, содержащие Na^+ и K^+ (табл. 1). При этом основным является пик иона $[M^{\text{AcSal}}+Na]^+$ с m/z 203.2, а интенсивности пиков ионов $[M^{\text{AcSal}}+Na]^+$ и $[M^{\text{AcSal}}+K]^+$ отличаются в 30 раз. Кроме того, в режиме отрицательных ионов AcSal ионизируется с образованием депротонированной формыmonoаниона $[M^{\text{AcSal}}-H]^-$ с m/z 179.0. Особенности масс-спектров с ионизацией электрораспылением индивидуальных гликозидов **1** и **2** были рассмотрены ранее [21].

В масс-спектре положительных ионов, полученном для смеси AcSal с гликозидом **1**, регистрируются пики ионов компонентов смеси, содержащие катионы Na^+ и K^+ (табл. 1). Среди них наиболее интенсивным является пик иона $[M^{\text{AcSal}}+Na]^+$. Кроме того, обнаружен малоинтенсивный пик $[M^1+M^{\text{AcSal}}+Na]^+$ с m/z 954.0, соответствующий образованию комплекса состава 1:1. В режиме отрицательных ионов также зафиксирован пик иона комплекса $[M^1+M^{\text{AcSal}}-H]^-$ с m/z 929.7 (рис. 2), имеющего аналогичное молярное соотношение гликозида **1** и AcSal.

В масс-спектре смеси AcSal с гликозидом **2** в режиме положительных ионов регистрируются сигналы монокатионов AcSal с Na^+ и K^+ , а для гликозида зафиксированы пики только его моно- и дикатионов с Na^+ . Как и в случае AcSal и

гликозида **1**, в ее смеси с гликозидом **2** преобладает пик иона $[M^{AcSal}+Na]^+$. В режиме регистрации положительных ионов не найдены пики, относящиеся к комплексам AcSal и гликозида **2**. Однако, в масс-спектре отрицательных ионов регистрируется пик иона комплекса $[M^2+M^{AcSal}-H]^-$ (m/z 1399.7), отвечающий составу комплекса 1:1 (рис. 3). Интенсивность пика иона $[M^2+M^{AcSal}-H]^-$ в 2.5 раза меньше интенсивности пика иона $[M^1+M^{AcSal}-H]^-$.

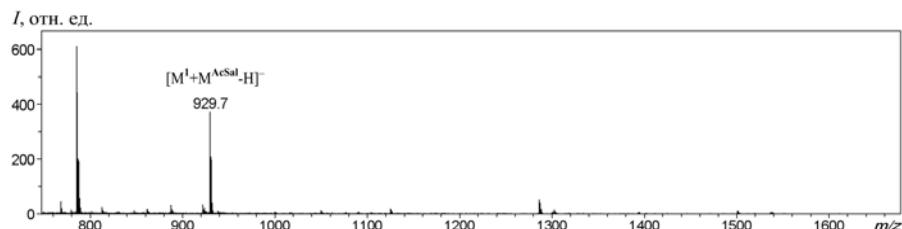


Рис. 2. Масс-спектр отрицательных ионов смеси гликозида **1** с AcSal.

Таблица 1

Масс-спектры смесей AcSal с гликозидами **1 и **2****

Ион	Соотношение m/z	$I_{отн.}$, %
<i>AcSal</i>		
$[M^{AcSal}-H]^-$	179.0	23.37
$[M^{AcSal}+Na]^+$	203.2	100
$[M^{AcSal}+K]^+$	219.2	3.34
<i>Смесь AcSal и гликозида 1</i>		
$[M^{AcSal}-H]^-$	179.1	45
$[4M^1-2H]^{2-}$	1500.2	0.02
$[M^1+M^{AcSal}-H]^-$	929.7	1.05
$[M^{AcSal}+Na]^+$	203.2	100
$[M^{AcSal}+K]^+$	219.2	1.71
$[M^1+Na]^+$	773.9	0.75
$[M^1+K]^+$	789.8	0.07
$[M^1+M^{AcSal}+Na]^+$	954.0	0.01
<i>Смесь AcSal и гликозида 2</i>		
$[M^{AcSal}-H]^-$	179.1	100
$[M^2+M^{AcSal}-H]^-$	1399.7	0.42
$[M^{AcSal}+Na]^+$	203.2	100
$[M^{AcSal}+K]^+$	219.2	1.67
$[M^2+2Na]^{2+}$	633.1	0.36
$[M^2+Na]^+$	1244.2	0.88

Гликозид **1** образует с AcSal более устойчивый комплекс, что, возможно, связано с наличием свободной (негликозилированной) карбоксильной группы в агликонной части его молекулы, тогда как у гликозида **2** карбоксильная группа участвует в образовании ацилгликозидной связи с трисахаридным фрагментом. В молекуле AcSal имеется карбоксильная группа, которая может участвовать в

образовании водородной связи с карбоксильной или гидроксильными группами гликозида **1**. Взаимодействие AcSal с гликозидом **2** может происходить за счет формирования водородной связи между ее карбоксильной группой и гидроксильными группами моносахаридных остатков гликозида. Ранее было показано, что комплексообразование AcSal с глициризиновой кислотой также сопровождается образованием межмолекулярных водородных связей [3].

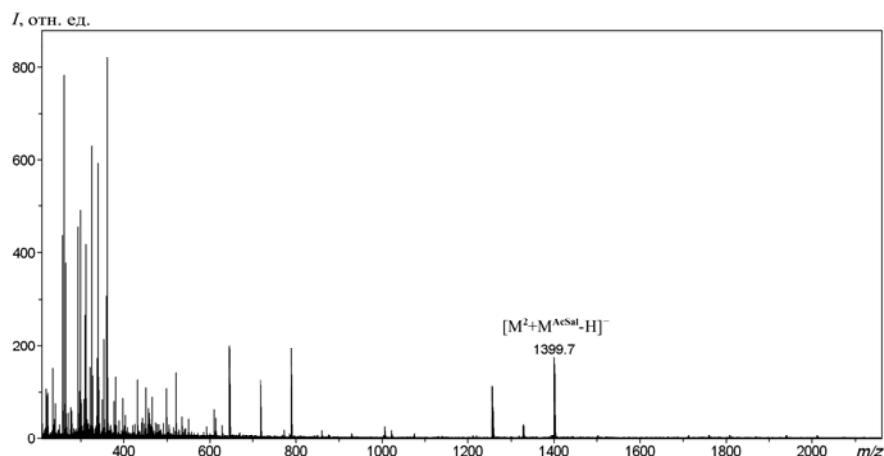


Рис. 3. Масс-спектр отрицательных ионов смеси гликозида **2** с AcSal.

В смесях AcSal с гликозидами **1** и **2** найдены только молекулярные комплексы состава 1:1. Аналогичная закономерность была ранее установлена масс-спектрометрически с ионизацией электрораспылением для комплексов этих гликозидов с парацетамолом [22] и левомицетином [16]. Как и AcSal, их молекулы содержат одно дизамещенное бензольное кольцо. Кроме того, в молекулах AcSal и парацетамола имеется ацетильный остаток. Между данными гликозидами и биологически активными молекулами мы также отмечали образование комплексов более разнообразного состава. Это было зафиксировано для пуриновых оснований нуклеиновых кислот [23], стрептоцида и ароматических аминокислот [16]. Однако во всех случаях комплексы состава 1:1 преобладали.

ВЫВОДЫ

1. Масс-спектрометрия с ионизацией электрораспылением впервые использована для изучения молекулярного комплексообразования AcSal с тритерпеновыми гликозидами. Показано, что гликозиды **1** и **2** образуют с AcSal комплексы состава 1:1, ионы которых регистрируются в масс-спектрах.
2. Формирование комплексов с AcSal эквимолекулярного состава подтверждает общую тенденцию, характерную для комплексов данных гликозидов и ряда биологически активных веществ ароматической природы.

3. Комплекс AcSal с монодесмозидным гликозидом **1** оказался более устойчивым, что можно объяснить наличием в его молекуле свободной карбоксильной группы, способной к образованию водородных связей.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ 11-03-12141-офи-м-2011, президента РФ МК-4425.2011 и гранта Минобрнауки РФ ДПННиТ №: 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. – 1997. – 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. Комплексы β -глицирризиновой кислоты с нестероидными противовоспалительными средствами как новые транспортные формы / Г.А. Толстиков, Л.А. Балтина, Ю.И. Муринов [и др.] // Хим.-фарм. журн. – 1991. – № 2. – С. 29–32.
4. ^{252}Cf Plasma desorption mass spectrometric study of interactions of steroid glycosides with amino acids / V.V. Pilipenko, L.F. Sukhodub, S.A. Aksyonov [et al.] // Rapid Commun. Mass Spectrom. – 2000. – Vol. 14. – P. 819–823.
5. 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.
6. Далимов Д.Н. Молекулярные комплексы моноаммониевой соли глицирризиновой кислоты с некоторыми лекарственными средствами и их интерферониндуцирующая активность / Д.Н. Далимов, Ю.Т. Исаев, А.М. Сайиткулов // Химия природ. соедин. – 2001. – № 2. – С. 132–134.
7. Антидотная и антирадикальная активность комплексов β -глицирризиновой кислоты с производными пиримидина / Г.А. Толстиков, В.А. Мышкин, Л.А. Балтина [и др.] // Хим.-фарм. журн. – 1996. – № 5. – С. 36–38.
8. Взаємодія стероїдних глікозидів з амінокислотами: дослідження методом плазменно-десорбційної мас-спектрометрії / В.В. Пилипенко, С.О. Аксонов, О.М. Калінкевич, Л.Ф. Суходуб // Biopolym. Cell. – 2000. – Т. 16, № 3. – С. 212–219.
9. Пилипенко В.В. Mac-spectrometric study of interactions of steroid glycosides and their interactions with biomolecules / V.V. Pilipenko, L.F. Sukhodub // Biopolym. Cell. – 2002. – Т. 18, № 2. – С. 139–141.
10. 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.
11. Суходуб Л.Ф. Стероїдні глікозиди рослинного походження та їх комплексоутворення з біомолекулами (за даними мас-спектрометрії) / Л.Ф. Суходуб, О.М. Калінкевич // Журн. Академії мед. наук України. – 2009. – Т. 15, № 2. – С. 225–245.
12. Pilipenko V.V. PDMS study of interactions of steroid glycosides with nucleoside and nucleotide / V.V. Pilipenko, L.F. Sukhodub, A.N. Kalinkevich // Вісник Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна: Біофіз. вісник. – 2004. – № 637, вип. 1–2. – С. 131–137.
13. Солодка: Биоразнообразие, химия, применение в медицине / [Г.А. Толстиков, Л.А. Балтина, В.П. Гранкина и др.]. – Новосибирск: Гео, 2007. – 311 с.
14. Толстиков Г.А. Комплексы β -глицирризиновой кислоты с лекарственными веществами как новые транспортные формы / Г.А. Толстиков, Ю.И. Муринов, Л.А. Балтина // Хим.-фарм. журн. – 1990. – № 8. – С. 26–27.
15. Фармакологическая активность комплексов нестероидных противовоспалительных препаратов с глицирризиновой кислотой, полученных методами жидкокфазного и твердофазного синтеза / И.В. Сорокина, Т.Г. Толстикова, М.П. Долгих [и др.] // Хим.-фарм. журн. – 2002. – № 1. – С. 12–13.
16. 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 wydawnyczyj dim, 2010. – Chapter 4. – P. 85–103.
17. Зузук Б.М. Плющ вьющийся *Hedera helix* L. / Б.М. Зузук, Р.В. Куцик, Л.И. Зузук // Провизор. – 2003. – № 12. – С. 13–14.
18. Яковишин Л.А. Молекулярное комплексообразование тритерпеновых гликозидов с аспирином / Л.А. Яковишин, В.И. Гришковец, Е.Н. Корж // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2012. – Т. 25, № 2. – С. 288–293.
19. Тритерпеновые гликозиды *Hedera taurica* I. Строение тауразида Е из листьев *Hedera taurica* / А.С. Шашков, В.И. Гришковец, А.А. Лолойко [и др.] // Химия природ. соедин. – 1987. – № 3. – С. 363–366.
20. Тритерпеновые гликозиды *Hedera canariensis* I. Строение гликозидов L-A, L-B₁, L-B₂, L-C, L-D, L-E₁, L-G₁, L-G₂, L-G₃, L-G₄, L-H₁, L-H₂ и L-I₁ из листьев *Hedera canariensis* / В.И. Гришковец, Д.Ю. Сидоров, Л.А. Яковишин [и др.] // Химия природ. соедин. – 1996. – № 3. – С. 377–383.
21. Самоассоциация и комплексообразование тритерпеновых гликозидов и холестерина / Л.А. Яковишин, Н.И. Борисенко, М.И. Руднев [и др.] // Химия природ. соедин. – 2010. – № 1. – С. 45–48.
22. Электроспрай-ионизация 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.
23. 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.

Лекарь Г.В. Електроспрай-іонізаційна мас-спектрометрія суміші тритерпенових глікозидів з ацетилсаліциловою кислотою (аспірином) / Г.В. Лекарь, Л.О. Яковішин, С.М. Борисенко, О.В. Ветрова, М.І. Борисенко, В.І. Гришковець // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2012. – Т. 25 (64), № 3. – С. 291–297.

Методом мас-спектрометрії з іонізацією електророзпиленням вперше досліджено комплексутворення ацетилсаліцилової кислоти (аспірину) з тритерпеновими глікозидами α -хедерином ($3-O-\alpha-L$ -рамнопіранозил-(1 \rightarrow 2)- $O-\alpha-L$ -арабінопіранозидом хедерагеніну) та хедерасапоніном С ($3-O-\alpha-L$ -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), вилучених з плюща. Глікозиди утворюють з ацетилсаліциловою кислотою молекулярні комплекси складу 1:1. Комплекс ацетилсаліцилової кислоти з α -хедерином є більш стійким.

Ключові слова: мас-спектрометрія з іонізацією електророзпиленням, тритерпенові глікозиди, α -хедерин, хедерасапонін С, ацетилсаліцилова кислота (аспірин), молекулярний комплекс.

Lekar A.V. Electrospray ionization mass spectrometry of mixtures of triterpene glycosides with acetylsalicylic acid (aspirin) / A.V. Lekar, L.A. Yakovishin, S.N. Borisenko, E.V. Vetrova, N.I. Borisenko, V.I. Grishkovets // Scientific Notes of Taurida V. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No. 3. – P. 291–297.

Using electrospray ionization mass spectrometry, the molecular complexation of acetylsalicylic acid (aspirin) with ivy triterpene glycosides α -hederin (hederagenin $3-O-\alpha-L$ -rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- $O-\alpha-L$ -arabinopyranoside) and hederasaponin C (hederagenin $3-O-\alpha-L$ -rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- $O-\alpha-L$ -arabinopyranosyl-28- $O-\alpha-L$ -rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- $O-\beta-D$ -glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- $O-\beta-D$ -glucopyranoside) was for the first time investigated. The glycosides form complexes with acetylsalicylic acid in the 1:1 molar proportion. The complex of acetylsalicylic acid with α -hederin is more stable.

Keywords: electrospray ionization mass spectrometry, triterpene glycosides, α -hederin, hederasaponin C, acetylsalicylic acid (aspirin), molecular complex.

Поступила в редакцию 18.09.2012 г.

Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского
Серия «Биология, химия». Том 25 (64). 2012. № 3. С. 298-303.

УДК: 615.838 : [502.4 : 504.062.2] (477.75)

КОМПЛЕКСНІ ДОКЛІНІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ЛІКУВАЛЬНИХ ГРЯЗЕЙ (ПЕЛОЇДІВ) ОЗЕРА ДЖАРИЛГАЧ АР КРИМ

Нікіпелова О.М., Горбач Л.П., Ніколенко С.І., Алексєєнко Н.О.

Український НДІ медичної реабілітації та курортології МОЗ України, Одеса, Україна
E-mail: center@kurort.odessa.net

Комплексні доклінічні дослідження лікувальних грязей (пелоїдів) озера Джарилгач АР Крим обґрунтували кондіційність, безпечність та можливість їх практичного використання у лікувальній практиці.

Ключові слова: пелоїди, озеро Джарилгач, АР Крим, доклінічні дослідження.

ВСТУП

Перші дослідження донних відкладів оз. Джарилгач проводились у 1925 р. [1]. Однак питання щодо їх бальнеологічної оцінки не ставилось. Тільки у 1974 р. уперше було здійснено рекогносцируальне обстеження («Геомінвод», Центральний научно-исследовательский институт курортологии и физиотерапии, г. Москва), що визначило перспективність пелоїдів оз. Джарилгач для використання у лікувальній практиці. Детальну розвідку родовища виконав «Геомінвод» у 1976 р., дорозвідку зроблено у 1987 р. цим же підприємством. У 2002 р. ДП «Сакська ГГРЕС» виконало рекогносцируальне обстеження оз. Джарилгач.

Представляло інтерес вивчити сучасний стан пелоїдів родовища.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Проби донних відкладів оз. Джарилгач відібрано у чотирьох точках центральної частини родовища (листопад 2008 р.). Проби пелоїдів відібрано згідно [2]. Фізико-хімічні дослідження проводились за методиками [2, 3], мікробіологічні – [4], експериментальні – [5–7].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Оз. Джарилгач розташоване в північно-західній частині Тарханкутського півострова на відстані 200 м від с. Міжводне Чорноморського району АР Крим.

За своїм генезисом водоймище є лиманним. Водоймище витягнуте з заходу на схід і в плані має грушеподібну форму, берега рівні, місцями порізані балочно-яружною мережею. Висота берегів 3–4 м, північно-західних – до 7 м.

Озеро являє собою затоплену морем балку, яка згодом відокремилась від Чорного моря. Довжина озера складає 8,0 км, найбільша ширина в західній частині

2,5 км, а в східній і поблизу устя балки Джарилгачської (Керлеутської) – до 0,3–0,4 км. Площа озера – 8,3 км². Глибини озера незначні. Найбільші глибини (0,89–0,90 м) зустрічаються у центральній частині водоймища. У весняний період найбільша глибина ропи може досягати 1,25 м у центральній частині озера (травень 2006 р.). Озерна котловина в цілому має блюдцеподібну форму, з більш-менш крутими бортами і відносно пологим дном, яке поступово занурюється до центру. Від моря озеро відділене піщано-гальковим пересипом шириною до 660 м і висотою по гребеню до 2 м.

Оз. Джарилгач безстічне, солоне. Живлення озера здійснюється за рахунок інфільтрації морських вод через пересип, розвантаження підземних вод понт-мэотичного водоносного комплексу та атмосферних опадів. На оз. Джарилгач добре виражені згонно-нагонні явища, при яких відзначається оголення мілководних ділянок дна озера і взмучування донних відкладів. У маловодні роки озеро повністю не пересихає, оголюється лише його мілководна східна частина. Замерзає воно не щорічно, а тільки в особливо холодні роки.

Донні відклади оз. Джарилгач представлено мулами темно-сірого кольору з фрагментами чорного, з запахом сірководню (вміст сірководню від 0,022 (т.203) до 0,038 (т. 71) %, які мають нейтральну реакцію середовища (значення pH становить 6,80 (т. 203) – 6,85 (т. 71, т. 127, т. 132) од. pH).

Показником напрямку окислюально-відновних процесів в відкладах є окислюально-відновний потенціал (Eh). Від'ємні значення Eh = (– 140)–(–260) mV свідчать про перевагу відновних процесів.

Значення масової частки вологи досліджених проб становить 54,95–57,41%, що відповідає вимогам, які висуваються до лікувальних грязей (пелоїдів) [8]. В зв'язку з такими показниками масової частки вологи вони характеризуються досить високими значеннями теплоємності 2,67–2,76 кДж/(кг·К) та мають добре теплові властивості.

Засміченість мінеральними частинками діаметром більше $0,25 \cdot 10^{-3}$ м складає 1,41 (т. 203)–2,64 (т.132) %, що відповідає допустимим значенням засміченості при використанні відкладів з лікувальною метою. Об'ємна вага аналізованих проб відкладів оз. Джарилгач становить від 1,39 до 1,41.

Важливими характеристиками донних відкладів з бальнеологічної точки зору є напруга зсуву та липкість, які обумовлюють пластиично-в'язкі властивості. Досліджені проби характеризуються м'якопластичною консистенцією, значною липкістю. Значення липкості коливаються в межах 791,46 (т.71)–1041,40 (т.127) Па та напруга зсуву – 306,56 (т.71)–613,12 (т.127) Па.

Як свідчать результати досліджень, ропа оз. Джарилгач за своїм складом є бромною, ортоборною хлоридною магнієво-натрієвою. Переважними компонентами макроскладу є хлорид-іони, іони натрію та магнію. Вміст бруму складає 150,40 мг/дм³, ортоборної кислоти – 110,56 мг/дм³. Мінералізація ропи становить 132,27 г/дм³.

За іонним складом розчин пелоїдів подібний складу ропи озера.

Таким чином, за основними фізико-хімічними показниками донні відклади оз. Джарилгач АР Крим відповідають вимогам, які висуваються до лікувальних

грязей (пелоїдів), що використовуються в бальнеології і відносяться до слабкосульфідних, високомінералізованих, хлоридних натрієвих, магнієво-натрієвих лікувальних грязей (пелоїдів).

Як відомо, в пелоїдогенезі приймають участь різні природні фактори, які формують визначений тип пелоїду. Особлива роль належить мікроорганізмам, продукти метаболізму яких збагачують пелоїди різними біологічно активними сполуками.

Одним з параметрів, які дозволяють оцінити високу терапевтичну активність пелоїдів та перспективність їх використання з лікувальною метою, є біологічна активність. Це інтегральне поняття, яке включає ряд таких критеріїв, як ферментативна активність пелоїдів, напруженість мікробіологічних процесів, антимікробні властивості у відношенні умовно-патогенних і патогенних для людини мікроорганізмів, наявність фармако-дінамічних компонентів та ін.

Значна мікробіологічна активність пелоїдів є їх характерною особливістю, яка виділяє пелоїди серед інших аналогічних природних утворень. Активна діяльність мікроорганізмів, які належать до різних таксономічних груп, сприяє розкладанню органічних залишків і збагачує донні відклади гуміновими речовинами, продукує сірководень, аміак, діоксид вуглецю та інші гази; тільки постійна активність мікроорганізмів забезпечує стійкий вміст у пелоїдах таких нестійких речовин, як вітаміни, ферменти та гормони. Завдяки здатності мікроорганізмів продукувати антибіотичні речовини, пелоїди здатні самоочищуватись після антропогенного навантаження у родовищах і регенеруватись після використання.

Вплив пелоїдів на життєдіяльність і персистентні особливості бактерій підтверджено експериментально [9]. Навіть слабкобактерицидні пелоїди пригнічувала здатність патогенних бактерій інактивірувати комплемент лізоцим і бактерицидний компонент препарату інтерферону, а також знижували гідрофобність бактеріальних клітин. При цьому ешеріхії зазнавали більшої, ніж стафілококи модифікуючої дії пелоїдів.

Наявність в пелоїдах бактерицидного ефекту відкриває можливість їхнього використання в якості природних антимікотичних засобів при грибкових виразках шкірних покривів, що викликаються рядом дерматофітів [10].

На користь того, що пелоїди мають бактерицидну дію, свідчать позитивні результати грязелікування відкритих інфікованих ран. Це ж підтвердили і подальші дослідження з кількісним обліком виживаємості патогенної мікрофлори в пелоїдах.

Виходячи з вищепереліченого, стає очевидною значна роль аутохтонної мікрофлори у пелоїдогенезі.

Результати мікробіологічних досліджень наведено у таблицях 1 – 2. Таксономічна структура мікробних ценозів досліджуваних відкладів представлена лише бактеріями.

Аналіз структури мікробних угрупувань за даними висіюваності мікроорганізмів окремих еколого-трофічних груп показав, що в досліджуваних відкладах переважали мікробіальні процеси трансформування азоту та вуглецьвмісних органічних речовин. Кількісне представництво кожної групи було індивідуальним.

Таблиця 1
Висіюваність мікроорганізмів різних таксономічних груп з донних відкладів
оз. Джарилгач (т. 127), КУО/г

Назва мікроорганізмів	КУО/г
Сaproфітні бактерії – продуценти каталази	$2,8 \cdot 10^4$
Олігокарбофільні бактерії	$9,2 \cdot 10^3$
Мікроорганізми, які засвоюють органічний азот	$3,8 \cdot 10^4$
Гетеротрофні бактерії – продуценти амінокислот	0
Амілолітичні	Суцільний ріст
Залізоокиснювальні	0
Марганецьоокиснювальні	0
Міксобактерії	0
Спороуттворювальні	0
Актиноміцети	0
Стрептоміцети	0
Дріжджі	0
Плісеневі гриби	0

Таблиця 2
Оцінка висіюваності мікроорганізмів різних еколого-трофічних груп з
донних відкладів оз. Джарилгач (т. 127), бали

Назва мікроорганізмів	Бали
Маслянокислі	5
Жиророзщеплюючі	0
Вуглеводнеокиснювальні	0
Сульфатвідновлювальні	2
Тіонові	5
Амоніфікувальні аероби	5
-"-продуценти NH_3	5
-"- продуценти H_2S	5
Амоніфікувальні анаероби	5
-"-продуценти NH_3	0
-"- продуценти H_2S	4
Денітрифікувальні	0
Целюлозоруйнівні аероби	0
Целюлозоруйнівні анаероби	0
Метанутворювальні	4

Вивчення мікробних ценозів відкладів оз. Джарилгач показало, що в них розвиваються, переважно, бактеріальні форми мікроорганізмів. Знайдено сaproфітні бактерії – продуценти каталази, амілолітичні, маслянокислі, бактерії, які засвоюють органічний азот, амоніфікувальні бактерії, які продукували H_2S та NH_3 . Біохімічні

процеси, завдяки яким у відкладах накопичуються аміак, ферменти каталаза, амілаза та протеаза, протікали досить активно.

Виявлено присутність метанутворювальних бактерій. Але серед мікроорганізмів, які приймають участь у кругообміну сірки, не підтверджено наявність такої важливої для пелоїдогенезу групи як сульфатвідновлювальні бактерії *Desulfovibrio desulfuricans*. Крім цього, у відкладах не виявлено антимікробної дії.

Відсутність у відкладах антимікробних властивостей можливо пов'язане з сезонним впливом на акваторію родовища. Для остаточного висновку щодо якісного стану донних відкладів необхідно провести додаткові мікробіологічні дослідження стосовно бактерицидної дії.

Експериментальними фізіологічними дослідженнями на тваринах встановлено, що відклади оз. Джарилгач безпечні для організму при зовнішньому застосуванні, але біологічною активністю володіють тільки пелоїди т. 127 та т. 132. центральної частини озера.

ВИСНОВОК

Виконаний комплекс досліджень донних відкладів оз. Джарилгач АР Крим щодо їх медико-біологічної оцінки якості та цінності встановлено, що відклади озера Джарилгач безпечні для організму при зовнішньому застосуванні, але біологічною активністю володіють тільки пелоїди центральної частини озера.

Список літератури

1. Курнаков Н.С. Соляные озера Крыма / Н.С. Курнаков, В.Г. Кузнецов, А.И. Дзенс-Литовский, М.И. Равич. – М.: изд-во Академии наук СССР, 1936. – 278 с.
2. Нікіпелова О.М. Посібник з методів контролю пелоїдів та препаратів на їх основі / О.М. Нікіпелова, Л.Б. Солодова. – Укр. н.-досл. ін-т мед. реабіл. та курорт. Ч.1. Фізико-хімічні дослідження. – Одеса, 2008. – 100 с.
3. Бахман В.И. Методика анализа лечебных грязей (пелоидов) / В.И. Бахман, К.А. Овсянникова, А.Д. Вадковская. – М., 1965. – 142 с.
4. Ніколенко С.І. Посібник з методів контролю лікувальних грязей, ропи та препаратів на їх основі / С.І. Ніколенко С.М. Глуховська, І.П. Ковальова. – Укр. н.-досл. ін-т мед. реабіл. та курорт. Ч.2. Мікробіологічні дослідження. – Одеса, 2002. – 72 с.
5. Алексєєнко Н.О. Посібник з методів досліджень природних та преформованих лікувальних засобів / Н.О. Алексєєнко, О.С. Павлова, Б.А. Насібуллін, А.С. Ручкіна. – Укр. н.-досл. ін-т мед. реабіл. та курорт. Ч.3. Експериментальні та доклінічні дослідження. – Одеса, 2002. – 115 с.
6. Каминский Л.С. Статистическая обработка лабораторных и клинических данных / Л.С. Каминский. – М., 1964. – 252 с.
7. Венчиков А.И. Основные приёмы статистической обработки результатов наблюдений в области физиологии / А.И. Венчиков, В.А. Венчиков – М.: Медицина, 1974. – 152 с.
8. Інструкція із застосування класифікації запасів і ресурсів корисних копалин державного фонду надр до родовищ лікувальних грязей. – Київ: ДКЗУ, 2002. – 49 с.
9. Звягинцев Д.Г. Почва и микроорганизмы / Д.Г. Звягинцев. – М., 1987. – 256 с.
10. Шинкаренко А.Л. Органические вещества лечебных грязей и их роль в механизме лечебного действия на организм / А.Л. Шинкаренко, Н.Г. Миленина. – Сб. науч. трудов Пятигорского НИИ курортологии и физиотерапии «Грязевые препараты». — Томск, 1981. – С. 30–33.

КОМПЛЕКСНІ ДОКЛІНІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ЛІКУВАЛЬНИХ...

Никипелова Е.М. Комплексные доклинические исследования лечебных грязей (пелоидов) озера Джарылгач АР Крым / Е.М. Никипелова, Л.П. Горбач, С.И. Николенко, Н.А. Алексеенко // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2012. – Т. 25 (64), № 3. – С. 298-303.

Комплексные доклинические исследования лечебных грязей (пелоидов) озера Джарылгач АР Крым обосновали их кондиционность, безопасность и возможность использования в лечебной практике.

Ключевые слова: пелоиды, озеро Джарылгач, АР Крым, доклинические исследования.

Nikipelova O.M., Gorbach L.P., Nikolenko S.I., Alekseenko N.O. Complete preclinical researches of therapeutic muds (peloids) Lake Dzharylgach Crimea / O.M. Nikipelova, L.P. Gorbach, S.I. Nikolenko N.O. Alekseenko // Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No. 3. – P. 298-303.

Complete preclinical researches of therapeutic muds (peloids) Lake Dzharylgach Crimea justified their conditioning, security and the possibility of use in medical practice.

Keywords: muds, Lake Dzharylgach, Crimea, preclinical research.

Поступила в редакцию 20.09.2012 г.

Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского
Серия «Биология, химия». Том 25 (64). 2012. № 3. С. 304-308.

УДК 541:546.547+547.097

БИОКОМПОЗИТЫ ИОДА С ПОЛИСАХАРИДАМИ

Панов Д.А.

*Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Украина
E-mail: mendes@inbox.ru*

В ходе работы было установлено, что иод влияет на конформацию макромолекул пектина и альгината. Иод образует с альгинатом комплекс красно-оранжевого цвета, а с пектином два типа комплексов: красно-оранжевого и фиолетового цветов.

Ключевые слова: яблочный и цитрусовый пектин, иод, биокомпозиты, полисахариды.

ВВЕДЕНИЕ

Иод принадлежит к числу важнейших микроэлементов, принимающих участие в механизмах жизнедеятельности высокоразвитых организмов. У человека биологическая роль иода заключается в обеспечении нормального состояния и функционирования щитовидной железы. Элементарный иод обладает антивирусной и антибактериальной активностью, которая представляет важнейшую характеристику антисептического действия. Однако, сильно раздражающий при попадании на кожу молекулярный иод может вызвать дерматиты. При приеме внутрь иода в токсических дозах (2–3 г) быстро развиваются симптомы острого отравления [1–4]. Токсичность иода ограничивает его применение в качестве антибактериального средства. Для этих целей значительно большее применение получили комплексные соединения иода с органическими полимерами (крахмал, поливиниловый спирт, пектин амаранта и другими). Антимикробная и противогрибковая активность иодполимерных соединений выше в 2–8 раз, чем у растворов иода. Кроме того, такие лекарственные формы менее токсичны и могут использоваться в значительно меньших дозах [5, 6].

Уникальная способность альгинатов и пектинов образовывать вязкие и гелеобразные растворы, биосовместимость и сорбционные свойства позволяют использовать эти полисахариды в качестве матрицы для удержания иода и для последующего его высвобождения.

Целью данной работы явилось изучение взаимодействие иода с альгинатом натрия и яблочным пектином.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе был использован альгинат натрия («Merck», США), полученный из морских водорослей и яблочный пектин (г. Барск), раствор иода (фиксант). Для

получения биокомпозитов были использованы раствора альгината натрия и пектина с концентрацией 0,005–1,0 г/дл, раствор иода 0,1 н., приготовленный из фиксанала.

Характерным свойством для растворимых полисахаридов является способность водных растворов к образованию прочных гелей. Этот процесс обусловлен ассоциацией макромолекул. Критическая концентрация ассоциатообразования (ККА) определялась вискозиметрическим и кондуктометрическим методами. Измерение вязкости полисахаридов проводили в капиллярном вискозиметре Оствальда с $d=0,56$ мм. При кондуктометрическом определении измеряли удельную электропроводность тех же растворов, что и для вискозиметрии. Измерения проводили на кондуктометре КЭЛ-1М с платиновыми электродами. По результатам измерений были рассчитаны значения ККА.

Изменения pH среды в процессе получения комплексов полисахаридов с иодом фиксировали с помощью иономера ЭВ-74 со стеклянным индикаторным электродом и хлорсеребряным электродом сравнения. Для полученных биокомпозитов полисахаридов с иодом были сняты абсорбционные спектры поглощения в диапазоне длин волн 250–750 нм, на спектрофотометре СФ-46.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате работы были определены значения ККА, показывающие при какой концентрации пектинов и альгинатов в растворе образуются агрегаты молекул. Значения данных величин определены двумя методами: кондуктометрическим и вискозиметрическим и составили, соответственно, $7,5 \times 10^{-3}$ г/дл для яблочного пектина и $1,0 \times 10^{-2}$ г/дл для альгината.

Альгинаты – полимерные молекулы, состоящие из блоков маннуроновой и гулуроновой кислот или областей между которыми могут находиться чередующиеся остатки обеих кислот. Пектини же представляют собой полисахариды, в которых первичными блоками полимерной цепи являются остатки D-галакuronовой кислоты, соединенные друг с другом α -(1→4)-гликозидной связью. Длинные цепи этих кислот могут перекрестно сшиваться в трехмерные цепи. Можно предположить, что молекулы иода внедряются в область, занимаемую макромолекулой, образуя так называемые комплексные соединения включения (взаимодействие по типу «гость-хозяин») [7]. Это предположение подтверждают экспериментальные данные.

Для растворов полисахаридов характерна существенная зависимость вязкости от концентрации. При изменении от 0,05 до 1,00 г/дл вязкость увеличивается в 2,5 раза, а в присутствии иода только в 1,5 раза; характеристическая вязкость (η) составляет 12,2 дL/g и в присутствии иода – 7,1 дL/g. Аналогичные изменения наблюдаются и для пектина. Уменьшение вязкости свидетельствует о взаимодействии полисахаридов с иодом, в результате которого происходит уменьшение объема занимаемого макромолекулой, а именно, изменение структуры полисахаридов из конформации беспорядочного клубка в макромолекулу со спирально свернутыми участками, внутрь которых включены молекулы иода.

Кроме того, в присутствии иода, наблюдается и уменьшение pH растворов полисахаридов – для альгинатов (0,1 г/дл) с 7,0 до 6,7, а для пектина (0,1 г/дл) с 4,7 до 4,0.

Для получения комплексов были использованы растворы альгината с концентрацией $3,2 \times 10^{-3}$ моль/л, пектина $1,1 \times 10^{-3}$ моль/л и иода $1,1 \times 10^{-3}$ и $2,4 \times 10^{-3}$ моль/л. Для полученных комплексов были сняты зависимости оптической плотности от длины волны в диапазоне 250–750 нм при варировании концентрации растворов полисахаридов и иода на спектрофотометре СФ-46. При этом отмечено, что для альгината натрия независимо от концентрации образуется один комплекс красно-оранжевого цвета (рис. 1), с максимумами поглощения при 290 и 350 нм (в соотношении альгинат-иод 2:1).

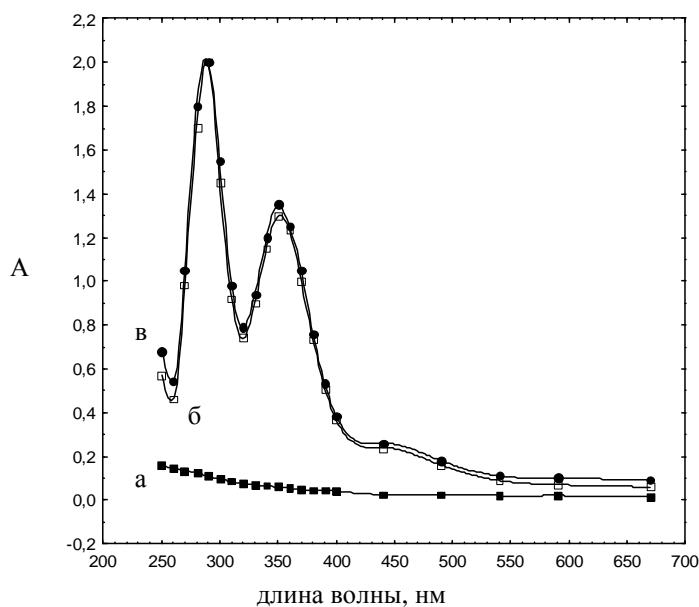


Рис. 1. Зависимость оптической плотности растворов альгината натрия и иода от длины волны.
 а – раствор альгината натрия ($3,2 \times 10^{-3}$ моль/л);
 б – раствор иода ($2,4 \times 10^{-3}$ моль/л);
 в – система иод-альгинат натрия.

В то время как для комплекса пектин-иод наблюдается два типа соединений: первый – в соотношении 1:4 и 1:1 образуется комплекс красно-оранжевого цвета с максимумами поглощения при 290 и 350 нм, второй – при избытке пектина (4:1) образуется комплекс фиолетового цвета с максимумом поглощения при 590 нм (рис. 2). Полученные данные вполне согласуются с литературными данными [6, 8].

Следует отметить, что комплексы иода с пектинами и альгинатами характеризуются мягкостью действия при обработке кожных покровов, а так же

превосходят по эффективности другие препараты, содержащие неорганические формы иода, по антисептическим свойствам [6].

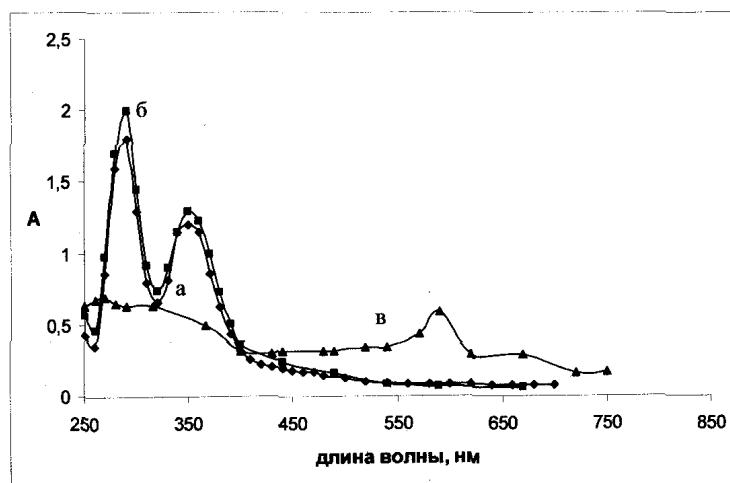


Рис. 2. Зависимость оптической плотности растворов пектина и иода от длины волны.

а – раствор, содержащий 2 мл пектина и 8 мл иода;
б – раствор иода;
в – раствор, содержащий 8 мл пектина и 2 мл иода.
Концентрации пектина – $1,1 \times 10^{-3}$ моль, иода – $1,1 \times 10^{-3}$

ВЫВОДЫ

1. Уменьшение вязкости и pH альгината и пектина в присутствии иода указывает на изменение структуры макромолекул полисахаридов.
2. Определено, что агрегаты молекул в растворе образуются при концентрации пектинов равной $7,5 \times 10^{-3}$ г/дл и альгинатов – $1,0 \times 10^{-2}$ г/дл, соответственно.
3. Установлено, что альгинат образует с иодом комплекс красно-оранжевого цвета ($\lambda_{\max} = 290$ и 350 нм), в то время как пектин имеет два типа комплексов: красно-оранжевого ($\lambda_{\max} = 290$ и 350 нм) и фиолетового ($\lambda_{\max} = 590$ нм) цвета.

Список литературы

1. Жукова Г.Ф. Иод. Свойства и распространение в окружающей среде / Г.Ф. Жукова, С.А. Савчик, С.А. Хотимченко // Микроэлементы в медицине. – 2004. – С. 1–6.
2. Viti P. Iodine deficiency disorders in Europe / P. Viti, T. Rago, A. Pinchera // Public Health Nutrition. – 2001. – P. 529–535.
3. Sherer T. Comparison of toxicity induced by iodine in male and female rats / T. Sherer, K. Thrall, R. Bull // Journal of Toxicology and Environmental Health. – 1991. – Vol. 32. – P. 89–101.
4. Корзун В.Н. Проблеми і перспективи профілактики іододефіцитних захворювань у населення України / В.Н. Корзун, А.М. Парац, А.П. Матвієнко // Ендокринологія. – 2006. – Т. 11, № 2. – С. 187–193.

5. Хотимченко Ю.С. Фармакология некрахмальных полисахаридов / Ю.С. Хотимченко, И.М. Ермак, А.Е. Бедняк и др. // Вестник ДВОРАН. – 2005. – № 1. – С. 72–82.
6. Офицеров Е.Н. Комплексы пектина амаранта с хитозаном и иодом / Е.Н. Офицеров, Л.А. Михеева, Э.Х. Офицерова // Химия и компьютерное моделирование. Бутлеровские сообщения. – 2000. – № 3. – С. 75–80.
7. Хотимченко Ю.С. Физико-химические свойства, физиологическая активность и применение альгинатов – полисахаридов бурых водорослей / Ю.С. Хотимченко, В.В. Ковалев, О.В. Савченко и др. // Биология моря. – 2001. – Т. 27, № 3. – С. 151–162.
8. Xiaochun Yu The complex of amylase and iodine / Yu Xiaochun Care Houtman, Rajai H. Atalba // Carbohydrate Research. – 1996. – Vol. 292. – P. 129–141.

Панов Д.О. Біокомпозити йоду з полісахаридами / Д.О. Панов // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2012. – Т. 25 (64), № 3. – С. 304-308.

В ході роботи було встановлено, що йод впливає на конформацію макромолекул пектину і альгінату. Йод утворює з альгінатом комплекс червоно-помаранчевого кольору, а з пектином два типи комплексів: червоно-помаранчевого і фіолетового.

Ключові слова: яблучний і цитрусовий пектини, йод, біокомпозити, полісахариди.

Panov D.A. Biocomposites of iodine with polysaccharides / D.A. Panov // Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No. 3. – P. 304-308.

During the work it was found, that iodine have influence on conformation of macromolecule of pectin and alginate. Iodine is formed with an alginate the complex of red-orange color, and with a pectin two types of complexes: red-orange and violet.

Keywords: apple and citrus pectins, iodine, biocomposites, polysaccharides.

Поступила в редакцию 25.09.2012 г.

УДК 541:546.57

НАНОКОМПОЗИТЫ НА ОСНОВЕ СЕРЕБРА И ПЕКТИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ

Панова Э.П., Кацева Г.Н.

*Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Украина
E-mail: mendes@inbox.ru*

Разработан способ получения нанокомпозитов серебра, в котором в качестве восстановителя-стабилизатора наночастиц применяется яблочный и цитрусовый пектин. Способ является простым и технологичным для получения уникальных наноразмерных материалов широкого спектра действия.

Ключевые слова. яблочный и цитрусовый пектин, карбоксильные группы, степень этерификации, наночастицы серебра.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы значительно увеличилось число исследовательских работ, посвященных получению и изучению свойств наноразмерных частиц серебра. Это связано с тем, что наночастицы серебра обладают уникальным набором ценных свойств, благодаря которым они служат материалом для создания электронных, оптических, бактериальных препаратов. Для получения наночастиц часто применяются токсичные и агрессивные химические восстановители и стабилизирующие вещества. Их негативное влияние на окружающую среду и здоровье человека сильно уменьшает привлекательность таких методов.

Известны методы получения стабильных металлических и биметаллических наночастиц путем восстановления ионов металла в обратных мицеллах (в тройной системе: водный раствор соли, поверхностно-активное вещество, предельный углеводород) [1]. В методе радиационно-химического синтеза восстановителями служат сольватированные электроны или другие восстановительные радикалы; при биохимическом синтезе – природные пигменты из группы флавоноидов [2].

Наиболее перспективным является направление нанохимии, связанное с синтезом наночастиц в полимерных матрицах, в частности, в водных растворах полимерных карбоновых кислот [3, 4].

В ряду поликарбоновых кислот особое место занимают биополимеры морского происхождения – альгинаты, отличающиеся широким спектром биологической активности. В синтезе наночастиц серебра альгинаты могут выступать одновременно в качестве восстановителя, стабилизатора и биологически активного вещества [5–7]. Поскольку пектиновые вещества – растительные полисахариды, обладающие схожими с альгинатами свойствами, то можно предположить, что нанокомпозиты серебра будут также иметь ряд ценных биологических свойств – бактерицидные, кровоостанавливающие, иммуномодулирующие и другие.

Целью данной работы являлось изучение взаимодействия яблочного и цитрусового пектинов с солями серебра, определение состава образующихся соединений, а также использование пектинов в качестве восстановителей – стабилизаторов наночастиц серебра.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве материалов для исследования были использованы нитрат серебра (х.ч.), синтезированный ацетат серебра, яблочный пектин (завод «Бендеры», г. Калининск), цитрусовый пектин (производство Италии), стандартизированные растворы гидроксида натрия и соляной кислоты, хлорида натрия (х.ч.), щавелевой кислоты (фиксант), водный 10% раствор аммиака.

Для приготовления исходных растворов пектинов (5×10^{-3} – 1×10^{-1} г/дл) навеску очищенных и высушенных полисахаридов растворяли в 100 мл дистиллированной воды, перемешивая на магнитной мешалке в течение 30–60 мин. Концентрацию ацетата серебра устанавливали методом осадительного титрования.

Содержание свободных карбоксильных групп (K_c) в полисахаридах определяли потенциометрическим титрованием стандартизированным раствором гидроксида натрия на иономере ЭВ-74 со стеклянным индикаторным электродом и хлорсеребрянным электродом сравнения.

Для изучения взаимодействия полисахаридов с солями серебра использовали кондуктометрический и вискозиметрический методы. Измерение электропроводности проводили на кондуктометре КЭЛ-1М с платиновыми электродами, покрытыми платиновой чернью; показания прибора фиксировали через 60 с. Конечная точка титрования определялась графическим и расчетным методами. Изменение относительной вязкости в процессе титрования измеряли с помощью вискозиметра Оствальда с $d=0,56$ мм.

Фотометрическое восстановление серебра проводили на воздухе при 20°C в колбах объемом 50 см³. В качестве источника света использовали ртутную лампу высокого давления ДРШ-250. Концентрацию наночастиц серебра определяли методом атомно-абсорбционной спектроскопии на спектрофотометре СФ-46 и КФК-3 в области длин волн 250–700 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате работы были определены основные физико-химические характеристики пектинов (табл. 1). Прежде всего, степень этерификации, определяемая по формуле:

$$E, \% = \frac{K_{\text{Э}}}{K_c + K_{\text{Э}}} \cdot 100,$$

где $K_{\text{Э}}$ – содержание этерифицированных карбоксильных групп; K_c – содержание свободных карбоксильных групп.

По результатам исследования можно сделать вывод, что лучшими комплексующими свойствами обладает яблочный пектин, для которого степень

етерификации составила 50% по сравнению с высокоэтерифицированным цитрусовым пектином со степенью этерификации 63%.

В таблице 1 приведены значения критической концентрации ассоциатообразования (ККА), показывающие, при какой концентрации пектинов в растворе начинают образовываться агрегаты молекул. Значения данных величин определены двумя методами: кондуктометрическим и вискозиметрическим и составили, соответственно $1,4 \times 10^{-2}$ г/дл для яблочного пектина и $1,6 \times 10^{-2}$ г/дл для цитрусового. Показатель кислотности растворов пектинов с концентрацией 0,1 г/дл составил pH=3,9.

Таблица 1

**Основные физико-химические характеристики исследуемых пектинов
(n=5; P=0,95)**

	K_c , % $\pm \epsilon$	K_E , % $\pm \epsilon$	E , %	ККА, г/дл	pH 0,1% раствора
Яблочный пектин	$6,88 \pm 0,04$	$6,74 \pm 0,16$	49,49	$1,4 \times 10^{-3}$	3,9
Цитрусовый пектин	$3,90 \pm 0,02$	$6,72 \pm 0,15$	63,30	$1,6 \times 10^{-3}$	3,9

Взаимодействие рассматриваемых пектинов с солями серебра было изучено кондуктометрическим и потенциометрическим методами. При титровании пектинов различных концентраций солями серебра было установлено, что наименьшие ошибки титрования наблюдаются в интервале концентраций 1×10^{-3} – 1×10^{-1} г/дл в щелочной среде при значениях pH=7,0–9,0. На кривых титрования наблюдается наличие двух точек перегиба, что свидетельствует об образовании двух соединений при избытке пектина. Состав соединений был определен путем расчета соотношений количеств прореагировавших карбоксильных групп и катионов серебра, которые близки к 2:1 и 1:1 (табл. 2).

С целью определения способа координации серебра лигандом были изучены ИК-спектры яблочного пектина и пектината серебра. В спектре пектината серебра наблюдалось смещение полос валентных колебаний карбоксильных групп, что указывает на образование связи пектин–металл. Кроме того, возникновение водородных связей с участием гидроксильных групп приводит к смещению максимумов поглощения в сторону меньших частот и увеличению ширины полосы поглощения, что и наблюдается в спектре пектината серебра.

В работе изучены закономерности образования нанокомпозитов серебра на основе яблочного и цитрусового пектинов. В синтезе использовали растворы нитрата и ацетата серебра различной концентрации, моль/л ($4,58 \times 10^{-4}$, $9,17 \times 10^{-4}$ и $2,07 \times 10^{-3}$), а также водные растворы пектинов с концентрацией 0,1 и 0,2 г/дл. О появлении наночастиц серебра свидетельствовало изменение цвета растворов от светло-желтого до темно-коричневого. О размерах наночастиц судили по спектрам оптического поглощения. Для данных спектров характерно появление полосы поглощения в диапазоне длин волн 380–420 нм, что отвечает формированию сферических наночастиц со средним диаметром 10–20 нм. При использовании

ацетата серебра наблюдается увеличение интенсивности в максимуме полос поглощения, что, вероятно, связано с повышением интенсивности процесса восстановления ионов серебра.

Таблица 2
Расчет соотношения COOH:Ag⁺ по результатам кондуктометрического титрования пектинов растворами солей серебра (n=5; P=0,95)

Пектин	$C(\text{COOH})$, моль/л	C_{Ag^+} , моль/л	$V_{\text{пектина}}$, мл	V_{Ag^+} , мл	COOH:Ag ⁺
Титрант – нитрат серебра AgNO_3					
Яблочный	$1,53 \times 10^{-3}$	$1,25 \times 10^{-2}$	10	0,60	$2,04 \pm 0,02$
	$1,53 \times 10^{-3}$	$1,25 \times 10^{-2}$	10	1,15	$1,06 \pm 0,02$
	$1,53 \times 10^{-3}$	$6,25 \times 10^{-3}$	10	1,10	$2,23 \pm 0,03$
	$1,53 \times 10^{-3}$	$6,25 \times 10^{-3}$	10	2,20	$1,11 \pm 0,02$
Цитрусовый	$8,69 \times 10^{-4}$	$1,25 \times 10^{-2}$	10	0,45	$1,98 \pm 0,04$
	$8,69 \times 10^{-4}$	$1,25 \times 10^{-2}$	10	0,75	$0,93 \pm 0,03$
	$8,69 \times 10^{-4}$	$6,25 \times 10^{-3}$	10	0,65	$2,14 \pm 0,04$
	$8,69 \times 10^{-4}$	$6,25 \times 10^{-3}$	10	1,15	$1,21 \pm 0,02$
Пектин	$C(\text{COOH})$, моль/л	C_{Ag^+} , моль/л	$V_{\text{пектина}}$, мл	V_{Ag^+} , мл	COOH:Ag ⁺
Титрант – ацетат серебра CH_3COOAg					
Яблочный	$1,53 \times 10^{-3}$	$8,65 \times 10^{-3}$	10	0,85	$2,08 \pm 0,03$
	$1,53 \times 10^{-3}$	$8,65 \times 10^{-3}$	10	1,70	$1,04 \pm 0,02$
	$1,53 \times 10^{-3}$	$4,33 \times 10^{-3}$	10	1,70	$2,08 \pm 0,04$
	$1,53 \times 10^{-3}$	$4,33 \times 10^{-3}$	10	3,50	$1,01 \pm 0,02$
Цитрусовый	$8,69 \times 10^{-4}$	$8,65 \times 10^{-3}$	10	0,55	$1,84 \pm 0,04$
	$8,69 \times 10^{-4}$	$8,65 \times 10^{-3}$	10	1,15	$0,87 \pm 0,01$
	$8,69 \times 10^{-4}$	$4,33 \times 10^{-3}$	10	1,05	$1,90 \pm 0,03$
	$8,69 \times 10^{-4}$	$4,33 \times 10^{-3}$	10	1,90	$1,05 \pm 0,01$

Использование 10% водного раствора аммиака позволяет существенно ускорить образование наночастиц серебра. Образование зародышей металлического серебра происходит за счет восстановления комплексных ионов концевыми альдегидными группами полисахарида. Восстановление ионов серебра в условиях использования его аммиачного комплекса не только сопровождается ростом поглощения, что

соответствует увеличению числа металлических частиц, и сдвигом положения пика. Спектры поглощения характеризуются интенсивной полосой с максимумом при длине волны 410 нм, что соответствует формированию сферических частиц диаметром 10 нм (рис. 1) [3].

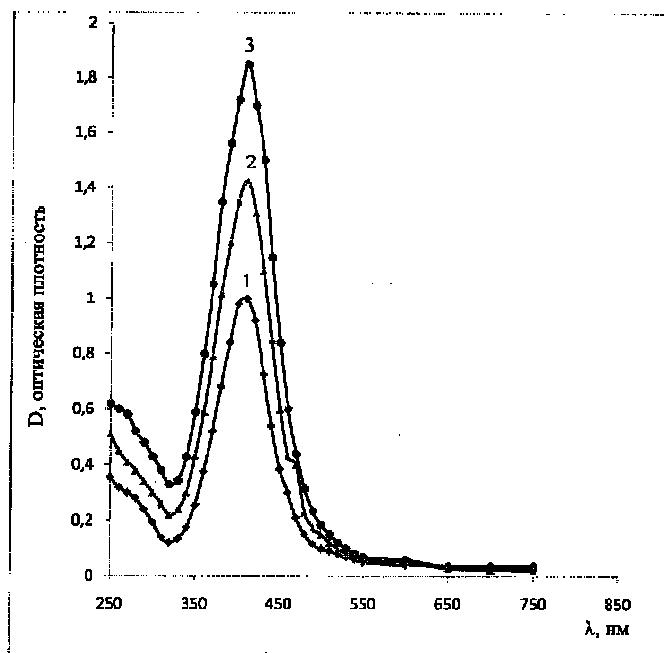


Рис. 1. Спектры оптического поглощения золя серебра, полученного в присутствии 0,1 г/дл яблочного пектина восстановлением AgNO_3 в 10% растворе аммиака и облучении в течение 30 минут. Концентрация AgNO_3 : 1 – $4,59 \times 10^{-4}$ моль/л; 2 – $9,17 \times 10^{-4}$ моль/л; 3 – $2,07 \times 10^{-3}$ моль/л.

Полученные образцы наночастиц серебра были стабильны в течение длительного времени (до шести месяцев), о чем свидетельствует отсутствие значительных изменений в их спектрах поглощения. Стабильность наночастиц достигается благодаря тому, что пектин создает вокруг них оболочку, препятствующую агрегации (рис. 2).

На микрофотографии видно, что темные частицы серебра окружены более светлой сферической биополимерной оболочкой пектина, имеющей размеры от 5 до 20 мкм. Принимая во внимание, что размер частиц серебра согласно спектрам поглощения, находится в интервале от 10 до 20 нм, можно предположить, что внутри одной полисахаридсодержащей гранулы композита расположено несколько металлических ядер. Нанобиокомпозиты на основе пектинов сочетают свойства стабилизирующей природной полисахаридной матрицы и наночастиц серебра, что может быть использовано для разработки высокоеффективных универсальных антимикробных средств. Совмещение свойств двух уникальных биологически активных компонентов особенно важно для применения в медицинской практике.

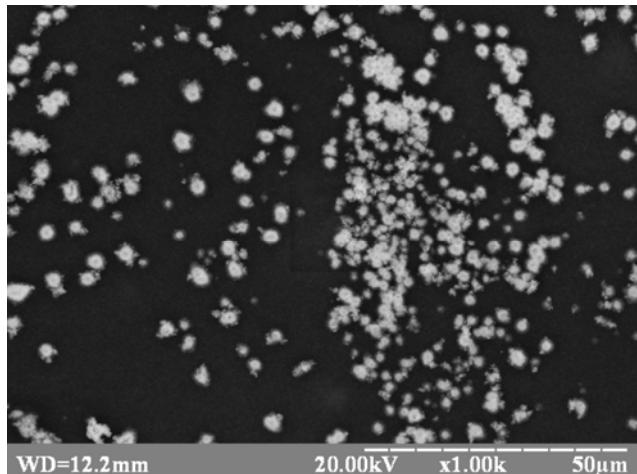


Рис. 2. Микрофотография нанобиокомпозитов серебра, полученных фотовосстановлением катионов серебра яблочным пектином.

ВЫВОДЫ

1. Определены основные физико-химические характеристики яблочного и цитрусового пектинов: содержание свободных и этерифицированных карбоксильных групп, степень этерификации, ККА.
2. Методами кондуктометрического и потенциометрического титрования исследовано взаимодействие пектинов с солями серебра. Установлено, что карбоксильные группы реагируют с катионами серебра в соотношениях, близких к 2:1 и 1:1.
3. Синтезированы нанобиокомпозиты серебра, содержащие в качестве стабилизирующей основы водные растворы яблочного и цитрусового пектинов.
4. Определены оптимальные условия, при которых происходит формирование устойчивых наноразмерных частиц серебра.

Список литературы

1. Егорова Е.М. Бактерицидные и катализитические свойства стабильных металлических наночастиц в обратных мицеллах / Е.М. Егорова, А.А. Ревина, Т.Н. Ростовщикова [и др.] // Вестник МГУ. Сер.2. Химия. – 2001. – Т. 42. – № 5. – С. 332–338.
2. Egorova E.M. Synthesis of metallic nanoparticles in reverse micelles in the presence of quercitin / E.M. Egorova, A.A. Revina // Colloids and Surfaces. : Physicochemical and Engineering Aspects. – 2000. – Vol. 168. – P. 87– 96.
3. Сергеев Б.М. Фотохимический синтез наночастиц серебра в водных растворах поликарбоновых кислот. Влияние полимерной матрицы на размер и форму частиц / Б.М. Сергеев, М.В. Кирюхин, Ф.Н. Бахов [и др.] // Вестник МГУ. Сер.2. Химия. – 2001. – Т. 42. – № 5. – С. 308–314.
4. Сухов Б.Г. Нанобиокомпозиты благородных металлов на основе арабиногалактана: получение и строение / Б.Г. Сухов, Г.П. Александрова, Л.А. Грищенко // Журн. структурной химии. – 2007.– Т. 48, № 5.– С. 979–984.
5. Патент на полезную модель 10539 Украины МКИ А 61 К 33/38, А 61 К 31/715. Способ получения водорастворимой бактерицидной композиции, содержащей наночастицы серебра / И.Н. Юркова,

- В.Р. Эстрела-Льопис, В.И. Рябушко [и др.]. – Заявлено 13.05.05, опубл. 15.11.05. Бюл. № 11.
6. Пархоменко Н.А. Антибактериальное и противогрибковое действие водорастворимой нанокомпозиции на основе серебра и морских биополимеров / Н.А. Пархоменко, И.Н. Юркова, В.И. Рябушко // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия: Биология, Химия. – 2009. – Т. 21(60). – № 2. – С. 106–112.
7. Юркова И.Н. Влияние физико-химических свойств альгината натрия на синтез наночастиц серебра / И.Н. Юркова, Д.А. Панов, В.И. Рябушко [и др.] // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия: Биология, Химия. – 2007. – Т. 20(59). – № 3. – С. 142–147.

Панова Е.П. Нанокомпозити на основі срібла і пектинових речовин / Е.П. Панова, Г.М. Кацєва //
Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2012. – Т. 25 (64), № 3. – С. 309-315.

Розроблений спосіб отримання нанокомпозитів срібла, в якому в якості відновника-стабілізатора наночасток застосовується яблучний та цитрусовий пектини, є простим і технологічним методом отримання унікальних нанорозмірних матеріалів широкого спектру дії.

Ключові слова. яблучний та цитрусовий пектини, карбоксильні групи, ступень етерифікації, наночастки срібла.

Panova E.P. Nanocompos on basis of silver and pectin substances / E.P. Panova, G.N. Katseva //
Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No. 3. – P. 309-315.

The worked out method of preparation of nanocomposites of silver where as a reductive-stabilizer agent of nanoparticle the apple and citrus pectin's are used is the simple and technological method of receipt of unique nanosize materials of wide action spectrum.

Keywords. apple and citrus pectin's, carboxyl groups, degree of etherification, nanoparticle of silver.

Поступила в редакцию 20.09.2012 г.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Алексеенко Наталья Олексіївна	ДУ «Український НДІ медичної реабілітації та курортології МОЗ України», провідний науковий співробітник, к.мед.н., тел. (0482) 301738, e-mail: center@kurort.odessa.net
Алиева Тамила Алиевна	Таврійський національний університет ім. В.І. Вернадського, аспірант кафедри фізіології людини та тварин та біофізики, e-mail: chadess@mail.ru
Баттерс Терри Д.	Інститут гликобіології Оксфордського університета, доцент факультета біохімії, завідувач лабораторії хімії та біології інгібіторів – іміносахарів
Бирюкова Елена Александровна	Таврійський національний університет ім. В.І. Вернадського, к.б.н., доцент кафедри фізіології людини та тварин та біофізики
Богдан Михайло Михайлович	Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України, провідний інженер відділу фізіології живлення рослин ІФРГ НАН України, e-mail: pracya_2010@ukr.net
Богданова Ольга Дмитриевна	Таврійський національний університет ім. В.І. Вернадського, аспірант кафедри фізіології людини та тварин та біофізики e-mail: bogdanova_86@mail.ru
Богдановская Надежда Васильевна	Запорізький національний університет, доктор біологіческих наук, професор кафедри фізичної реабілітації, e-mail: nadezhdaabg@rambler.ru
Большаков Леонид Леонидович	Одесський центр криміналистичної експертизи, заведуючий лабораторією
Борисенко Ніколай Іванович	Еколого-аналітический центр Южного федерального університета, кандидат хіміческих наук, доцент, директор
Борисенко Сергей Николаевич	НІІ фізичної та органічної хімії Южного федерального університета, кандидат хіміческих наук, старший науковий співробітник
Валиев Энвер Велиуллаевич	РВУЗ «Кримський інженерно-педагогічний університет», старший преподаватель кафедри технологического образования, e-mail: enervaliev@rambler.ru
Ветрова Елена Владимировна	НІІ фізичної та органічної хімії Южного федерального університета, кандидат біологіческих наук, старший науковий співробітник

Вірич Павло Анатолійович	Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України, інженер І категорії відділу фізіології живлення рослин ІФРГ НАН України, e-mail: Sphaenodon@ukr.net
Вовчук Ірина Леонідовна	Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова, кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии биологического факультета
Вяткина Оксана Валер'євна	Таврійський національний університет ім. В.І. Вернадського, кафедра фізичної і аналітическої хімії, к.х.н., доцент; e-mail: oksana_vyatkina@list.ru
Горбач Леонід Павлович	ДУ «Український НДІ медичної реабілітації та курортології МОЗ України», провідний гідрогеолог, тел. (0482) 301741, e-mail: center@kurort.odessa.net
Гришковець Владимир Іванович	Таврійський національний університет ім. В.І. Вернадського, доктор хіміческих наук, професор, заведуючий кафедрою фізичної і аналітическої хімії.
Гусев Алексей Николаевич	Таврійський національний університет ім. В.І. Вернадського, кандидат хіміческих наук, доцент кафедри общей химии, e-mail: galex0330@rambler.ru
Давыдов Вадим Вячеславович	ГУ «Інститут охорони здоров'я дітей і підлітків НАМН України», доктор мед. наук, професор, заведуючий лабораторією вікової ендокринології та обміну речовин, професор кафедри биохимії Харківського національного університета імені В.Н. Каразіна, e-mail: vaddavydov@mail.ru
Данилова Анастасія Олеговна	Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова, аспирант кафедры биохимии, e-mail: olgaivdan@mail.ru
Древетняк Наталия Андреевна	Таврійський національний університет ім. В.І. Вернадського, аспирант кафедри фізіології людини та тварин та біофізики e-mail: ashk@mail.ru
Евстигнеев Максим Павлович	Севастопольский национальный технический университет, д-р физ.-мат. наук, профессор кафедры физики
Ёлкина Наталья Маратовна	Кримский факультет Запорожского национального университета, кафедра физического воспитания, спорта и здоровья человека
Запорожченко Александр Викторович	Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова, кандидат биологических наук, доцент, заведующий кафедрой биохимии, проректор по учебной работе

Зильберварг Елена Васильевна	ЮФ НУБиП Украины «КАТУ», факультет лесного, садово-паркового и охотничьего хозяйства, старший преподаватель кафедра фитодизайна и ботаники, e-mail: zironika07@rambler.ru
Зильберварг Ирина Руслановна	ЮФ НУБиП Украины «КАТУ», к. б. н., доцент кафедры биотехнологий, генетики и физиологии растений, факультет лесного, садово-паркового и охотничьего хозяйства, e-mail: zironika07@rambler.ru
Каменчук Ольга Петрівна	Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України, молодший науковий співробітник відділу фізіології живлення рослин
Кацева Галина Николаевна	Таврійський національний університет ім. В.І. Вернадського, ст. преподаватель кафедры физической и аналитической химии
Кириллова Алла Викторовна	Таврійський національний університет ім. В.І. Вернадського, кандидат біологіческих наук, доцент кафедри фізіології людини та тварин
Кметко Ірина Львовна	Донецький національний університет, аспірантка кафедри фізіології людини та тварин
Кобильник Сніжана Николаевна	ОНУ ім. І.І. Мечникова, аспірант кафедри біохімії біологічного факультета, e-mail: kobylnik71@mail.ru
Ковблюк Ніколай Михайлович	Таврійський національний університет ім. В.І. Вернадського, доцент кафедри зоології, e-mail: kovblyuk@mail.ru
Королева Анна Владимировна	Таврійський національний університет ім. В.І. Вернадського, випускниця аспірантури кафедри біохімії, e-mail: anna.undymiel@gmail.com
Костюк Александра Сергіївна	Таврійський національний університет ім. В.І. Вернадського, асистент кафедри фізіології людини та тварин та біофізики, e-mail: alexkostyuk@mail.ru
Кропотов Валерий Алексеевич	Таврійський національний університет ім. В.І. Вернадського, кафедра фізической и аналитической химии, к.х.н., доцент, e-mail: vkropotov@crimea.edu
Кузнецова Людмила Николаевна	Інститут сільського господарства Крима НААН, кандидат біологіческих наук, ведущий науковий сотрудник лабораторії мікробіометода захисту растень, відділ мікробіології, e-mail: solanum@ukr.net
Кулешова Дарья Константиновна	ГУ «Інститут охорони здоров'я дітей і підлітків НАМН України», аспірант лабораторії вікової ендокринології та обміну речовин, лаборант-врач лабораторії клініко-діагностичної лабораторії, e-mail: darya.kuleshova@gmail.com

Кулибаба Елена Владимировна	ОНУ им. И.И.Мечникова, аспирант кафедры биохимии, e-mail: Lenuka.87@mail.ru
Кучеров Виктор Александрович	Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова, младший научный сотрудник лаборатории физико-химических методов исследования на биологическом факультете
Лекарь Анна Владимировна	НИИ физической и органической химии Южного федерального университета, младший научный сотрудник
Лисицкая Лидия Александровна	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, студентка кафедры зоологии 4 курса, e-mail: lisliдиya@gmail.com
Майданская О.Д.	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, студентка кафедры физиологии человека и животных и биофизики
Маковейчук Тетяна Іванівна	Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України, кандидат біологічних наук, молодший науковий співробітник відділу фізіології живлення рослин ІФРГ НАН України, e-mail: makoveyt@ukr.net
Мацюра Александр Владимирович	Мелитопольский государственный педагогический университет имени Богдана Хмельницкого, заведующий кафедрой экологии и зоологии
Мацюра Марина Викторовна	Мелитопольский государственный педагогический университет имени Богдана Хмельницкого, ассистент кафедры экологии и зоологии, e-mail: amatsyura@gmail.com
Мешкова Светлана Борисовна	Физико-химический институт им. А.В. Богатского Национальной академии наук Украины, Одесса, Украина, доктор химических наук, профессор
Миронова Татьяна Олеговна	Институт биологии южных морей НАН Украины, им. А.О.Ковалевского, младший научный сотрудник отдела, морской санитарной гидробиологии, e-mail: fresia58@mail.ru
Михальська Людмила Миколаївна	Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України, молодший науковий співробітник відділу фізіології живлення рослин, e-mail: Mykhalskaya_L@ukr.net
Муравьева Ирина Петровна	Институт биологии южных морей НАН Украины, им. А.О.Ковалевского, младший научный сотрудник отдела, морской санитарной гидробиологии, e-mail: imuraveva@mail.ru
Нікіпелова Олена Михайлівна	ДУ «Український НДІ медичної реабілітації та курортології МОЗ України», керівник Українського державного центру стандартизації і контролю якості природних та преформованих засобів, старший науковий співробітник, к.х.н., тел. (0482) 301740, e-mail: center@kurort.odessa.net

Никифоров Іван Ростиславович	Тавріческий національний університет ім. В.І. Вернадського, преподаватель кафедри валеології і безпеки жизнедеяльності, e-mail: nikiforoir@mail.ru
Ніколенко Світлана Вікторівна	ДУ «Український НДІ медичної реабілітації та курортології МОЗ України», старший науковий співробітник, к.б.н., тел. (0482) 328201, e-mail: center@kurort.odessa.net
Омельчук Сергій Тихонович	Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, завідувач кафедри гігієни харчування, декан медичного факультету № 4 медичного факультету Чернігівського філіалу НМУ, доктор медичних наук, професор
Оришака Олеся Васильєвна	Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, ст. лаборант кафедры биохимии биологического факультета
Павленко Владимир Борисович	Тавріческий національний університет ім. В.І. Вернадського, доктор біологіческих наук, професор кафедри фізиології людини і тварин та біофізики, e-mail: pavlenkovb@crimea.edu
Панов Денис Александрович	Тавріческий національний університет ім. В.І. Вернадського, к.х.н., доцент кафедри фізичної та аналітичної хімії, тел. (0652) 608497, e-mail: mendes@inbox.ru
Панова Светлана Алексеевна	Тавріческий національний університет ім. В.І. Вернадського, кандидат біологіческих наук, доцент кафедри фізиології людини і тварин та біофізики
Панова Елеонора Павловна	Тавріческий національний університет ім. В.І. Вернадського; к.х.н., доцент кафедри фізичної та аналітичної хімії, тел. (0652) 608497, e-mail: mendes@inbox.ru
Парілова Олена Олександрівна	Інститут біохімії ім..О.В. Палладіна НАНУ, інженер 1-ої категорії відділу регуляції обміну речовин
Песковец Светлана Александровна	ЮФ НУБиП України «КАТУ», студентка 5 курса, факультет лесного, садово-паркового и охотничьего хозяйства
Петров Сергей Анатольевич	ОНУ ім. І.І. Мечникова, д.б.н., професор кафедри біохимії біологіческого факультета
Письменецкая Ирина Юрьевна	Днепропетровская государственная медицинская академия, доцент кафедры биохимии, медицинской и фармацевтической химии, e-mail: pirina2004@list.ru
Раваєва Марина Юрьевна	Тавріческий національний університет ім. В.І. Вернадського, кандидат біологіческих наук, доцент кафедри фізиології людини і тварин та біофізики, e-mail: mravaeva@ukr.net

Разумнова Анастасия Юрьевна	ОНУ им. И.И. Мечникова, студентка кафедры биохимии биологического факультета
Савушкина Ирина Геннадьевна	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, к.б.н., доцент кафедры лесного и садово-паркового хозяйства, e-mail: limodorum2001@rambler.ru
Сандецька Надія Василівна	Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України, аспірант відділу фізіології живлення рослин, e-mail: 1snv@ukr.net
Симчук Андрей Павлович	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биохимии, e-mail: simchuk@ukr.net
Ситар Оксана В.	Київський національний університет імені Тараса Шевченка, e-mail: spirulina2003@ukr.net
Скамрова Галина Борисовна	Севастопольский национальный технический университет, аспирант кафедры физики, e-mail: galina_skamrova@mail.ru
Соболев Валерий Иванович	Донецкий национальный университет, доктор биол. наук, профессор, зав. кафедрой физиологии человека и животных, e-mail: v.sobolev@mail.ru
Станишевская Татьяна Ивановна	Мелитопольский государственный педагогический университет, кандидат биол. наук, доцент
Токарчук Катерина Олександрівна	Інститут біохімії ім..О.В. Палладіна НАНУ, аспірант відділу регуляції обміну речовин, e-mail: katiywa@ukr.net
Трибрат Наталия Сергеевна	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, кандидат биологических наук, ассистент кафедры физиологии человека и животных и биофизики, e-mail: tribratnatalia@rambler.ru
Трушкин Александр Николаевич	Севастопольский национальный технический университет, канд. техн. наук, доцент кафедры радиотехники
Туманянц Каринэ Николаевна	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, кандидат биологических наук, научный сотрудник по ПНИЛ, преподаватель кафедры медико-биологических основ физической культуры, e-mail: timur328@gmail.com
Чуян Елена Николаевна	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, первый проректор, доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой физиологии человека и животных и биофизики, e-mail: elena-chuyan@rambler.ru

Швартай Віктор Валентинович	Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України, Заступник директора з наукової роботи ІФРГ НАН України, член-кореспондент НАН України, доктор біологічних наук, e-mail: schwartau@mail.ru
Шейх-Заде Мамет-Ісмет	РВУЗ «Кримський інженерно-педагогіческий університет», кандидат фізико-математических наук, доцент кафедри технологіческого образования
Шкорбатов Юрій Георгієвич	Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна, доктор біол. наук, старший науковий сотрудник
Шульгин Віктор Федорович	Таврійський національний університет ім. В.І. Вернадського, проректор по науковій роботі, доктор хіміческих наук, професор, завідувач кафедрою обичної хімії, тел. (0652)-60-81-60, e-mail: vshul@crimea.edu
Эйсмонт Евгения Владимировна	Таврійський національний університет ім. В.І. Вернадського, младший науковий сотрудник кафедри фізіології людини та тварин та біофізики, e-mail: jema07@mail.ru
Яковишин Леонід Александрович	Севастопольський національний технічний університет, кандидат хіміческих наук, доцент кафедри фізики (цикл хімії), e-mail: chemsevntu@rambler.ru.
Янцев Александр Вікторович	Таврійський національний університет ім. В.І. Вернадського, кандидат біологіческих наук, доцент кафедри фізіології людини та тварин та біофізики
Ярмолюк Наталія Сергіївна	Таврійський національний університет ім. В.І. Вернадського, кандидат біологіческих наук, преподаватель кафедри медико-біологіческих основ фізичної культури, e-mail: nat_yarm@mail.ru

СОДЕРЖАНИЕ

БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

Алиева Т.А., Эйсмонт Е.В., Павленко В.Б.

ВЛИЯНИЕ КУРСА СЕАНСОВ НЕЙРОТЕРАПИИ НА ХАРАКТЕРИСТИКИ
ВЫЗВАННЫХ ПОТЕНЦИАЛОВ ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ 3

Богдан М.М.

ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСНЫХ УДОБРЕНИЙ НА ПОКАЗАТЕЛИ
СТРУКТУРНОГО АНАЛИЗА ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ 11

Богдановська Н.В.

ГЕНДЕРНІ ВІДМІННОСТІ МЕТАБОЛІЗМУ L-АРГІНІНУ В СПОРТСМЕНІВ 16

Вірич П.А., Маковейчук Т.І., Швартау В.В.

ВПЛИВ ТРИНЕКСАПАК-ЕТИЛУ НА ВМІСТ АНІОНІВ У РОСЛИНАХ
HORDEUM VULGARE L 27

Данилова А.О., Запорожченко О.В., Большаков Л.Л.

ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ ПРЕПАРАТІВ З ПРОБОЮТИЧНИМИ МІКРООРГАНІЗМАМИ
НА МОРФОМЕТРИЧНІ ПОКАЗНИКИ ТОВСТОГО КІШКІВНИКА, ПЕЧІНКИ,
ПІДШЛУНКОВОХ ЗАЛОЗИ ЩУРІВ З АЛЛОКСАНОВИМ ДІАБЕТОМ 31

Ёлкина Н.М.

СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ ГЕМОГЛОБИНА В ЭРИТРОЦИТАХ БОЛЬНЫХ
ЭРИТРОЕМИЕЙ 42

Зильберварг И.Р., Зильберварг Е.В., Песковец С.А.

ПРОЕКТНЫЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ ПО ОЗЕЛЕНЕНИЮ ТЕРРАСИРОВАННОГО
СКЛОНА НА ТЕРРИТОРИИ ПАРТЕРНОГО СКВЕРА ДВОРЦА КУЛЬТУРЫ
ПРОФСОЮЗОВ В Г. СИМФЕРОПОЛЬ 45

Кметко И.Л., Соболев В.И.

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЫ БЕЛЫХ КРЫС
В ХОДЕ РАЗВИТИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ГИПЕРТИРЕОЗА 52

Кобильник С.М., Разумнова А.Ю., Петров С.А.

ВИВЧЕННЯ БАЛАНСУ ТІАМІНУ В М'ЯЗАХ ДОНОРА ПІСЛЯ
АЛОТРАНСПЛАНТАЦІЇ ЕМБРІОНАЛЬНОЇ ТКАНИНИ 61

Ковблюк Н.М.

ПЕРВЫЕ ДАННЫЕ О ВИДОВОМ СОСТАВЕ ПАУКОВ (ARACHNIDA, ARANEI)
КАЗАНТИПСКОГО ПРИРОДНОГО ЗАПОВЕДНИКА (КРЫМ) 66

Королёва А.В., Симчук А.П.

ИЗМЕНЧИВОСТЬ RAPD-PCR СПЕКТРОВ ДНК МОРСКОГО ЕРША В
СЕВАСТОПОЛЬСКИХ БУХТАХ С РАЗНОЙ СТЕПЕНЬЮ АНТРОПОГЕННОГО
ЗАГРЯЗНЕНИЯ 74

Костюк А.С.	
СЕЗОННАЯ И ИНФРАДИАННАЯ РИТМИКА НОЦИЦЕПЦИИ ИНТАКТНЫХ МОЛЛЮСКОВ <i>HELIX ALBESCENS</i>	81
Кузнецова Л.Н.	
ВЫДЕЛЕНИЕ И БИОТЕСТИРОВАНИЕ АКТИВНЫХ ШТАММОВ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> BERLINER ИЗ НАСЕКОМЫХ ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ КРЫМА	89
Кулешова Д.К., Даевыдов В.В.	
АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ УТИЛИЗАЦИИ ЭНДОГЕННЫХ АЛЬДЕГИДОВ В КРОВИ ПОДРОСТКОВ С ОЖИРЕНИЕМ, ОСЛОЖНЕННЫМ ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТЬЮ	95
Кулибаба Е.В., Разумнова А.Ю., Петров С.А.	
ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ ТРАНСАМИНАЗ И СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКА ПРИ АЛЛОТРАНСПЛАНТАЦИИ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ И СФОРМИРОВАННЫХ МЫШЕЧНЫХ ТКАНЕЙ.....	103
Лисицкая Л.А.	
МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КРЕВЕТОК <i>PALAEMON ADSPERSUS</i> И <i>PALAEMON ELEGANS</i> (PALAEMONIDAE) ИЗ ЧЕРНОМОРСКИХ ВОД ЮГО-ЗАПАДНОГО КРЫМА (М. КАЯ-БАШ И БАЛАКЛАВСКАЯ БУХТА).	109
Мацюра О.В., Мацюра М.В.	
СТРУКТУРА ВИДОВОГО РІЗНОМАНІТТЯ ОСТРІВНИХ УГРУПОВАНЬ ПТАХІВ СИВАШУ	115
Михальська Л.М., Швартау В.В., Омельчук С.Т.	
МЕТАБОЛІЗМ ПІНОКСАДЕНУ В РОСЛИНАХ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ.....	129
Мураєв'єва И.П., Миронова Т.О.	
ЛИПИДНО-УГЛЕВОДОРОДНЫЙ СОСТАВ <i>MYTILUS GALLOPROVINCIALIS</i> (LAMARCK, 1819) ИЗ ОБРАСТАНИЙ ГИДРОТЕХНИЧЕСКИХ СООРУЖЕНИЙ АРТИЛЛЕРИЙСКОЙ БУХТЫ (СЕВАСТОПОЛЬ, ЧЁРНОЕ МОРЕ).....	137
Оришака О.В., Вовчук И.Л., Кучеров В.А., Петров С.А.	
ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ТИАМИНПИРОФОСФОКИНАЗЫ ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ МИОМЕТРИЯ.....	145
Письменецька І.Ю., Баттерс Т.Д.	
ПРОГНОЗУВАННЯ СТРУКТУР ВІЛЬНИХ ОЛІГОСАХАРИДІВ ПЛАЗМИ КРОВІ ПРАКТИЧНО ЗДОРОВИХ ДОНОРІВ	158
Раваєва М.Ю.	
РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА В РЕАЛИЗАЦИИ МИКРОВАСКУЛЯРНЫХ ЭФФЕКТОВ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО МИЛЛИМЕТРОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ	165
Савушкина И.Г.	
ВЛИЯНИЕ СОДЕРЖАНИЯ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ В ЛИСТЬЯХ ДУБА ПУШИСТОГО НА СОСТАВ МИКРОСООБЩЕСТВА НАСЕКОМЫХ-ФИТОФАГОВ	171

Сандецька Н.В., Каменчук О.П., Ситар О.В. ВПЛИВ УМОВ МІНЕРАЛЬНОГО ЖИВЛЕННЯ НА ЗМІНИ АНТИОКСИДАНТНОГО СТАТУСУ РОСЛИН ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ.....	179
Скамрова Г.Б., Евстигнеев М.П., Трушкин.А.Н., Шкорбатов Ю.Г. ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ И МАГНИТНОЙ СОСТАВЛЯЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ПОЛЯ НА ПРОНИЦАЕМОСТЬ МЕМБРАН И СОСТОЯНИЕ ХРОМАТИНА В ЯДРАХ КЛЕТОК БУККАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ ЧЕЛОВЕКА	187
Станишевская Т.И. ХАРАКТЕР ЗАВИСИМОСТИ ТЕПЛОВОЙ СТОИМОСТИ МЫШЕЧНОГО СОКРАЩЕНИЯ ОТ УРОВНЯ ЦИРКУЛИРУЮЩЕГО СВОБОДНОГО ТРИЙОДТИРОНИНА У БЕЛЫХ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ТИРЕОТОКСИКОЗЕ	196
Токарчук К.О., Парілова О.О. ПОРІВНЯЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ЦИТОТОКСИЧНОЇ ДІЇ АКРОЛЕІНУ ТА ФОРМАЛЬДЕГІДУ НА ТИМОЦИТИ ЩУРА В УМОВАХ <i>IN VITRO</i>	206
Туманянц К.Н., Ярмолюк Н.С. ВЛИЯНИЕ СЛАБЫХ ЭМП КРАЙНИХ ЧАСТОТНЫХ ДИАПАЗОНОВ НА ДИНАМИКУ И ИНФРАДИАННУЮ РИТМИКУ РЕГЕНЕРАТОРНЫХ ПРОЦЕССОВ У ПЛАНАРИЙ <i>DUGESIA TIGRINA</i>	215
Чуян Е.Н., Древетняк Н.А., Богданова О.Д., Раваева М.Ю., Трибрат Н.С. ТИПОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ ЖИВОТНЫХ.....	222
Чуян Е.Н., Никифоров И.Р., Бирюкова Е.А. ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ СЕРДЕЧНОГО РИТМА ИСПЫТУЕМЫХ В ВОСТАНОВИТЕЛЬНОМ ПЕРИОДЕ ПОСЛЕ ВЕЛОЭРГОМЕТРИЧЕСКОЙ ПРОБЫ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ КРАЙНЕ ВЫСОКОЙ ЧАСТОТЫ.	240
Янцев А.В., Кириллова А.В., Панова С.А., Майданская О.Д. ВЛИЯНИЕ ЭФИРНОГО МАСЛА КЕДРА НА СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТУЮ СИСТЕМУ ЧЕЛОВЕКА.	256
 ХИМИЧЕСКИЕ НАУКИ	
Валиев Э.В., Шейх-Заде М.И. ПРИМЕНЕНИЕ ФАКТОРНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ УСЛОВИЙ ЭКСПЕРИМЕНТА, МИНИМИЗИРУЮЩИХ ОТНОСИТЕЛЬНУЮ ПОГРЕШНОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНСТАНТЫ РАВНОВЕСИЯ ОБРАЗОВАНИЯ КОМПЛЕКСОВ С ВОДОРОДНОЙ СВЯЗЬЮ	267
Вяткина О.В. ПРОБЛЕМЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПЕРОКСИДАЗ	271

Гусев А.Н., Шульгин В.Ф., Мешкова С.Б.	
ВЛИЯНИЕ РАЗМЕРНЫХ ФАКТОРОВ НА ФОТОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ КОМПЛЕКСА ЦИНКА С 3-(ПИРИДИН-2-ИЛ)-5-(2- САЛИЦИЛИДЕННИМИНОФЕНИЛ)-1Н-1,2,4-ТРИАЗОЛОМ	277
Кропотов В.А.	
СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕКОТОРЫХ МЕТОДОВ ОЦЕНКИ ВОСПРОИЗВОДИМОСТИ ПАРАМЕТРОВ КРИВОЙ КОМПЛЕКСИМЕТРИЧЕСКОГО ТИТРОВАНИЯ	283
Лекарь А.В., Яковишин Л.А., Борисенко С.Н., Ветрова Е.В., Борисенко Н.И., Гришковец В.И.	
ЭЛЕКТРОСПРЕЙ-ИОНИЗАЦИОННАЯ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ СМЕСЕЙ ТРИТЕРПЕНОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ С АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТОЙ (АСПИРИНОМ)	291
Нікіпелова О.М., Горбач Л.П., Ніколенко С.І., Алексєєнко Н.О.	
КОМПЛЕКСНІ ДОКЛІНІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ЛІКУВАЛЬНИХ ГРЯЗЕЙ (ПЕЛОЇДІВ) ОЗЕРА ДЖАРИЛГАЧ АР КРИМ	298
Панов Д.А.	
БИОКОМПОЗИТЫ ИОДА С ПОЛИСАХАРИДАМИ	304
Панова Э.П., Кацева Г.Н.	
НАНОКОМПОЗИТЫ НА ОСНОВЕ СЕРЕБРА И ПЕКТИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ	309
СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ	316
СОДЕРЖАНИЕ	323