

Журнал основан в 1918 г.

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

Научный журнал

*Серия “Биология, химия”*

**Том 27 (66). № 3**

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

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

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

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

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

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

Гольдин П.Е. – к.б.н., доц.  
Ивашов А.В. – д.б.н., проф.  
Коношенко С.В. – д.б.н., проф.  
Коренюк И. И. – д.б.н., проф.  
Котов С.Ф. – к.б.н., доц.  
Лебедева Н.Н. – д.б.н., проф.  
Макарчук Н.Е. – д.б.н., проф.  
Мартынюк В.С. – д.б.н., проф.  
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.

**Раздел «Химия»:**

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

**Печатается по решению Ученого Совета Таврического национального университета  
им. В.И. Вернадского, протокол № 10 от 14.11.2014 г.**

Подписано в печать 17.11.2014 формат 70x100/16  
17,75 усл. п. л. 14,95 уч.-изд. л. Тираж 500. Заказ № 17/а.  
Отпечатано в информационно-издательском отделе ТНУ,  
пр. Вернадского 4, г. Симферополь, 95007

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

Науковий журнал. Том 27 (66), №3, Біологія, хімія.  
Сімферополь, Таврійський національний університет ім. В.І.Вернадського, 2014  
Журнал заснований у 1918 р.

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

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

# БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

---

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

Серия «Биология, химия». Том 27 (66). 2014. № 3. С. 3-13.

**УДК 577.152.34:612.62:616**

## **ФАКТОРЫ РИСКА, РОЛЬ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ И ИХ РЕЦЕПТОРОВ В РАЗВИТИИ ГИНЕКОМАСТИИ**

*Вовчук И.Л.*

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

В обзоре обобщены данные литературы относительно частоты встречаемости, факторов риска и роли стероидных гормонов в развитии гинекомастии у мужчин. Показано, что наиболее распространенной является идиопатическая форма гинекомастии, связанная с возрастными расстройствами эндокринной системы, действием лекарственных препаратов, гипогонадизмом, другими сопутствующими болезнями и встречающаяся у мужчин в пубертатном возрасте и в андропаузе. Установлены факторы риска развития гинекомастии: половое созревание, возрастные тестикулярные расстройства, побочное действие лекарственных препаратов, увеличение массы тела и толщины подкожного жирового слоя, трисомия 4-й хромосомы, синдромом Кляйнфельтера, нарушение соотношения андрогенов и эстрогенов. У больных с неидиопатической гинекомастией в сыворотке крови снижено содержание свободного тестостерона, лютеинизирующего и/или фолликулостимулирующего гормонов и повышено содержание эстрогенов и пролактина. Увеличение содержания стероидных гормонов в опухолевой ткани приводит к эстрогенстимулируемой пролиферации клеток опухоли. Идиопатическая гинекомастия не связана с риском злокачественного перерождения грудной железы в первые два года после возникновения. Гинекомастия, сопутствующая синдрому Кляйнфельтера, связана с высоким риском малигнизации.

**Ключевые слова:** гинекомастия, опухоль, гормоны, сыворотка крови, молочная железа.

### **ВВЕДЕНИЕ**

В связи с ухудшением экологической обстановки, изменением образа жизни, ранним половым развитием и общим ростом числа онкологических заболеваний проблема опухолевых заболеваний грудной железы у мужчин в настоящее время приобретает все большую актуальность. Гинекомастия – доброкачественная опухоль грудной железы, которая наблюдается у 32-65 % мужчин преимущественно в критические периоды жизни: послеродовой, пубертатный, в андропаузе [1]. Главной причиной возникновения гинекомастии считают нарушение соотношения андрогенов и эстрогенов [2-4]. По мнению некоторых авторов в опухолевой ткани увеличивается содержание стероидных гормонов [3], что приводит к эстрогенстимулируемой пролиферации клеток опухоли и увеличению активности некоторых лизосомальных протеиназ, в частности, катепсина D [5].

Целью представленной работы является анализ и обобщение данных литературы относительно частоты встречаемости и факторов риска в возникновении этого заболевания и исследование уровня стероидных гормонов при гинекомастии.

### ОБЗОР ЛИТЕРАТУРНЫХ ДАННЫХ

**Факторы риска развития гинекомастии у мужчин.** Гинекомастия часто сопутствует различным физиологическим расстройствам в мужском организме. Наиболее распространенными факторами риска являются половое созревание, возрастные тестикулярные расстройства, побочное действие лекарственных препаратов [6]. Вероятность развития идиопатической гинекомастии возрастает с увеличением массы тела и толщины подкожного жирового слоя [2]. Гинекомастия может быть вызвана сопутствующими заболеваниями: пролактиномой гипофиза [7], синдромом полной и частичной нечувствительности к андрогенам, неврологическими нарушениями [8, 9], ожирением, заболеваниями печени, тиротоксикозом, дефицитом 17-гидроксистероид-редуктазы, синдромом Кляйнфельтера, опухолями печени, надпочечников и яичек (клеток Сертоли и Лейдига) [8, 10, 11, 12], диабетом [13], трисомией 4-й хромосомы [14]. Гинекомастия может быть связана с мутацией гена, кодирующего ароматазу, что приводит к повышенной активности этого фермента [15]. Имеются также сведения о том, что гинекомастия передается по аутосомно-доминантному принципу [8, 16]. К гинекомастии приводят кастрация и функциональный препубертатный гипогонадизм [17]. Гинекомастия возникает также при лечении высокими дозами эстрадиола [18], антиэстрогенами [6], кетоконазолом, циклоспорином А, циметидином [18], метотрексатом [19], фенотиазанами, трициклическими антидепрессантами [5], антиандрогенами, спиронолактоном, нейролептическими средствами [20]. Гинекомастия встречается у 21-34 % [21] – 52 % [22] спортсменов, употребляющих стероидные анаболики, причем вероятность развития опухоли выше при хроническом употреблении больших доз анаболиков [21, 23].

Различные авторы сообщают о связи между гинекомастией и ВИЧ. Опухоль может быть вызвана как непосредственно вирусом [24, 25], так и антиретровирусной терапией, в том числе с использованием ингибиторов протеаз [26, 27].

Однако, по мнению некоторых авторов, гинекомастия не связана с риском злокачественного перерождения грудной железы, в особенности в первые два года после возникновения [28–30]. В то же время гинекомастия, сопутствующая синдрому Кляйнфельтера, в отличие от идиопатической, связана с высоким риском малигнизации [31].

**Частота встречаемости гинекомастии грудной железы у мужчин.** Гинекомастия – наиболее распространенное опухолевое заболевание грудной железы у мужчин. Ее доля по разным источникам составляет 57,5 – 87,3 % среди других доброкачественных новообразований у мужчин [32, 33]. По информации различных авторов, гинекомастия встречается у 32 – 65 % мужчин [1], причем в более 50 % случаев выявляется идиопатическая гинекомастия. Среди индуцированных опухолей большинство связаны с возрастными расстройствами эндокринной системы,

действием лекарственных препаратов, гипогонадизмом и другими сопутствующими болезнями [2, 6, 9]. Гинекомастия наиболее распространена в пубертатном возрасте и в андропаузе [6]. Частота пубертатной гинекомастии колеблется от 4 до 69 % в зависимости от изучаемой популяции и критериев диагностики [1, 2, 34]. В большинстве случаев она спонтанно регрессирует к 18 годам (через 2-3 года после возникновения опухоли) [35, 36]. Случаи гинекомастии в препубертатном возрасте редки [35], часто они являются следствием опухоли желез внутренней секреции [37, 38]. Переходная гинекомастия наблюдается у 60 – 90 % новорожденных в результате стимуляции материнскими эстрогенами [34]. Билатеральная гинекомастия наблюдается в 31–48 % случаев [2, 32, 39], при этом она более часто развивается вследствие гипогонадизма и сопутствующих опухолей, в то время как идиопатическая гинекомастия преимущественно унилатеральная [2].

#### **Роль рецепторов стероидных гормонов в развитии опухолей грудной железы.**

Среди более 62 белковых веществ, участвующих в опухолевом перерождении молочной железы, важнейшую роль играют рецепторы стероидных гормонов – андрогенов и эстрогенов. Классификация опухолей по наличию рецепторов не только облегчает клиническое диагностирование и терапию, но и дает информацию о возможных механизмах развития добро- и злокачественных новообразований.

В нормальной ткани грудной железы позитивные по рецепторам эстрогенов (ER+) клетки, составляющие меньшинство, окружены ER– клетками и распределены поодиночке, [15, 40]. При гинекомастии наблюдается пролиферация ER+ клеток, отмечается увеличение доли клеток, одновременно экспрессирующих ER и фактор пролиферации Ki67 [15]. В работах Sasano [41] во всех представленных случаях гинекомастии выявлены клетки, положительные по рецепторам андрогенов (AR), эстрогенов (ER) и прогестерона (PR), процент положительных клеток эпителия протоков железы был значительно выше, чем в случае злокачественной опухоли. Была установлена прямая корреляция содержания AR с ER и PR. Однако исследованиями Shoker было показано, что содержание ER+ клеток в ткани при гинекомастии (43 %), как и в нормальной ткани мужской грудной железы (63 %), соответствует доброкачественной опухоли с низким риском злокачественного перерождения у женщин [15]. При этом высокой концентрации ER соответствовало низкое содержание эстрогенов, как и у женщин в период постменопаузы.

Исследования, проведенные на трансгенных мышах, показали, что возможна индукция экспрессии ER и PR в ткани мужской грудной железы при гиперэкспрессии ароматазы, участвующей в синтезе женских половых гормонов [42–44]. У экспериментальных животных наблюдалось развитие молочной железы по женскому типу, сходное с клинической картиной гинекомастии у человека. Эффект индукции наблюдался также у людей, употребляющих стероидные анаболики [23]. Содержание AR и ER в описанных случаях превышало норму ( $65 \pm 10$  и  $52 \pm 5$  пмоль/мг белка в цитозоли,  $33 \pm 7$  и  $67,5 \pm 9$  пмоль/мг белка в ядрах). 85% опухолевой ткани содержали AR либо ER, а 40 % содержали оба рецептора. Таким образом, высокая степень позитивности гинекомастии по рецепторам стероидных гормонов наблюдается при индукции синтеза либо при интенсивном употреблении этих гормонов.

Причинами развития ER+ гинекомастии могут быть также нечувствительность к андрогенам [9] или нарушение соотношения между эстрогенами и андрогенами. В исследованиях Pensler описаны случаи гинекомастии у пациентов с синдромом Кляйнфельтера [31]. У больных отмечался повышенный уровень ЕК и РК и связанный с этим риск злокачественного перерождения. У пациентов с идиопатической гинекомастией не было выявлено высокое содержание ER и PR, что дает возможность объяснить низкую вероятность развития у них карциномы.

**Содержание гормонов в крови и опухолевой ткани при гинекомастии.** В клинической диагностике важнейшее значение придают исследованию содержания стероидных и гонадотропных гормонов в крови и в опухолевой ткани.

*Стероидные гормоны.* Одной из причин гинекомастии является нарушение соотношения андрогенов и эстрогенов в ткани грудной железы, при этом абсолютные значения концентрации гормонов могут не отличаться от нормальных, в особенности при идиопатической гинекомастии [2, 34]. Было показано, что высокая частота выздоровления наблюдалась при возрастании соотношения концентрации тестостерона к концентрации эстрадиола [45]. Однако соотношение плазменных концентраций андрогенов и эстрогенов при гинекомастии не всегда отличается от таковых в контрольной группе [2]. Авторы отмечают понижение концентрации свободного тестостерона в сыворотке крови больных гинекомастией по сравнению с контрольной группой [2, 4, 46]. Факторами, повышающими относительное содержание эстрогенов, могут быть ароматизация андрогенов в результате повышенной экспрессии ароматазы в ткани опухоли и в жировой ткани при ожирении; синтез эстрогенов клетками опухолей надпочечников, семенников и простаты; лекарственная терапия с применением антиандрогенов и эстрогенов; прием анаболиков и наркотиков, подавляющих синтез андрогенов; повышенный синтез эстрогенов в результате генетических нарушений (синдром Кляйнфельтера, мутации гена, кодирующего ароматазу); гипогонадизм и гипофункция гонад (вследствие патологии органов внутренней секреции либо возрастных изменений); нарушение механизма распада эстрогенов в результате заболевания печени [8, 15, 22, 47]. Так, при терапии с применением эстрадиола в дозах 20 мг наблюдалось повышение его содержания в сыворотке до  $192 \pm 23$  пмоль/литр (норма – 33,1–132,4 пмоль/литр по [45]) и связанная с этим гинекомастия [18]. В опытах на обезьянах введение эстрогенов вызывало гинекомастию, причем максимальный эффект наблюдали при постоянном воздействии малыми дозами [3]. Понижение содержания тестостерона в сыворотке (норма – 306–1031 наног/децилитр [45]) отмечают при опухолях надпочечников: гиперплазии – наног/децилитр [4], аденокарциноме – 260 наног/децилитр [38], аденоме – 251 наног/децилитр [10]; при этом увеличивается содержание эстрадиола – 1283 пикомоль/литр [38], 496 пикомоль/литр [10]. Установлена также отрицательная корреляция между содержанием тестостерона, массой тела и толщиной подкожной жировой клетчатки [2]. Гинекомастию может вызвать наличие антиандрогенов и эстрогенов в косметических препаратах и средствах бытовой химии [48, 49]. Некоторые лекарства оказывают ингибирующее воздействие на ферменты, участвующие в окислении эстрадиола и таким образом тормозящие его катаболизм, что способствует накоплению гормона [50].

Гинекомастия может возникать у новорожденных в результате стимуляции материнскими эстрогенами, содержащимися в молоке при лактации [34].

*Пролактин.* Одним из факторов развития гинекомастии считают гиперпролактинемия – увеличение содержания пролактина в плазме крови. Гиперпролактинемия – основная причина развития опухолей груди при гипофизарно-гипоталамических нарушениях, преимущественно при аденоме и пролактиноме гипофиза [7, 51, 52]. Гиперпролактинемия также могут вызвать критические состояния организма (стресс) и лекарственные препараты: фенотиазины, бутирофеноны, трициклические антидепрессанты, резерпин, циметидин, эстрогены, опиоиды [47]. Зависимость между содержанием пролактина и возрастом пациентов, страдающих гинекомастией, не обнаружена [7]. При карциноме грудной железы увеличение содержания пролактина в плазме не выявлено [53].

*Гонадотропные гормоны.* Фоллитропин и лютропин играют важную роль в синтезе андрогенов и развитии мужских половых органов. Многие исследователи отмечают уменьшение сывороточного содержания лютеинизирующего и/или фолликулостимулирующего гормонов при гинекомастии [2, 10, 23, 38]. Подавление синтеза гонадотропинов может быть вызвано повышенной концентрацией эстрогенов [2, 10, 38] и пролактина, употреблением морфина и метадона [47]. Установлена корреляция между содержанием тестостерона и лютеинизирующего гормона и уменьшение содержания лютропина при увеличении массы жировой ткани [2]. Для повышения содержания гонадотропинов при гинекомастии и карциноме грудной железы некоторые авторы предлагают использовать гонадолиберин [10, 54].

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Гинекомастия – доброкачественная опухоль грудной железы, наблюдаемая у мужчин в послеродовом, пубертатном периодах и в андропause.
2. Факторами риска развития гинекомастии у мужчин являются половое созревание, возрастные тестикулярные расстройства, побочное действие лекарственных препаратов, увеличение массы тела и толщины подкожного жирового слоя, трисомия 4-й хромосомы синдромом Кляйнфельтера, нарушение соотношения андрогенов и эстрогенов. Гинекомастия может быть вызвана сопутствующими заболеваниями: гиперпролактинемией, полной и частичной нечувствительностью к андрогенам, дефицитом 17-гидроксистероид-редуктазы, кастрацией, высокими дозами эстрадиола, антиэстрогенов, нейролептиков и анаболических стероидов.
3. Идиопатическая гинекомастия не связана с риском злокачественного перерождения грудной железы в первые два года после возникновения. Гинекомастия, сопутствующая синдрому Кляйнфельтера, связана с высоким риском малигнизации.
4. Частота встречаемости гинекомастии грудной железы у мужчин составляет 32,0 – 87,3 % среди других доброкачественных новообразований у мужчин и наиболее распространена в пубертатном возрасте и в андропause. Более 50 % случаев гинекомастии составляет идиопатическая гинекомастия связанная с возрастными расстройствами эндокринной системы, действием лекарственных препаратов, гипогонадизмом и другими сопутствующими болезнями.

5. При гинекомастии установлена пролиферация ER<sup>+</sup> клеток и увеличение доли клеток, одновременно экспрессирующих ER и фактор пролиферации K167.
6. У больных с неидиопатической гинекомастией в сыворотке крови снижено содержание свободного тестостерона, лютеинизирующего и/или фолликулостимулирующего гормонов и повышено содержание эстрогенов и пролактина. В опухолевой ткани увеличивается содержание стероидных гормонов, что приводит к эстрогенстимулируемой пролиферации клеток опухоли.

#### Список литературы

1. Rogers S. Expression of cathepsin D and estrogen receptor in male breast carcinoma / S. Rogers, C.A. Day, S.B. Fox // *Hum. Pathol.* – 1993. – Vol. 24, № 2. – P. 148-151.
2. Ersoz H. Causes of gynaecomastia in young adult males and factors associated with idiopathic gynaecomastia / H. Ersoz, M.E. Onde, H. Terekeci [et al.] // *Int. J. Androl.* – 2002. – Vol. 25, № 5. – P. 312-316.
3. Geschickter C.F. Tumors of the breast related to the oestrogen hormone / C.F. Geschickter, D. Lewis, C.G. Hartman // *Am. J. Cancer.* – 1934. – № 21. – P. 828-859.
4. Rapetti S. An unusual case of Cushing's syndrome due to ACTH- independent macronodular adrenal hyperplasia / S. Rapetti, G. Francia, C. Iacono [et al.] // *Chir. Ital.* – 2003. – Vol. 55, № 2. – P. 235-241.
5. Cavailles V. Estrogens and growth factors induce the mRNA of the 52 K-pro-cathepsin D secreted by breast cancer cells / V. Cavailles, P. Augereau, M. Garcia, H. Rochefort // *Nucl. Acids Res.* – 1989. – 16, № 5. – P. 1903-1919.
6. Mathur R. Gynecomastia: pathomechanisms and treatment strategies / R. Mathur, G.D. Braunstein // *Horm. Res.* – 1997. – Vol. 48, № 3. – P. 95-102.
7. Delgrange E. Influence of age on the clinical presentation of prolactinomas in male patients / E. Delgrange, D. Mailer, J. Donckier, J. Toumiaire // *Gerontology.* – 1999. – Vol. 45, № 3. – P. 160-164.
8. Braunstein G.D. Aromatase and gynecomastia / G.D. Braunstein // *Endocr. Relat. Cancer.* – 1999. – Vol. 6, № 2. – P. 315-324.
9. Sher E.S. Evaluation of boys with marked breast development at puberty / E.S. Sher, C.J. Migeon, G.D. Berkovitz // *Clin. Pediatr. (Phila).* – 1998. – Vol. 37, № 6. – P. 367-371.
10. Kuhn J.M. Cosecretion of estrogen and inhibin B by a feminizing adrenocortical adenoma: impact on gonadotropin secretion / J.M. Kuhn, H. Lefebvre, C. Duparc // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2002. – Vol. 87, № 5. – P. 2367-2375.
11. Piolat C. Testicular Leydig cell hyperplasia in children / C. Piolat, J.F. Dyon, N. Chavanis [et al.] // *Prog. Urol.* – 2003. – Vol. 13, № 1. – P. 110-114.
12. Venara M. Sertoli cell proliferations of the infantile testis: an intratubular form of Sertoli cell tumor? / M. Venara, R. Rey, I. Bergada [et al.] // *Am. J. Surg. Pathol.* – 2001. – Vol. 25, № 10. – P. 1237-1244.
13. Weinstein S.P. Diabetic mastopathy in men: imaging findings in two patients / S.P. Weinstein, E.F. Conant, S.G. Orel [et al.] // *Radiology.* – 2001. – Vol. 219, № 3. – P. 797-799.
14. Burhano R.R. Trisomy 4 in a case of gynecomastia / R.R. Burhano, J.B. Neto, P. Philbert [et al.] // *Cancer Genet. Cytogenet.* – 2000. – Vol. 117, № 2. – P. 143-145.
15. Shoker B.S. Abnormal regulation of the oestrogen receptor in benign breast lesions / B.S. Shoker, C. Jarvis, R.B. Clarke [et al.] // *J. Clin. Pathol.* – 2000. – Vol. 53, № 10. – P. 778-783.
16. Matsuura E.A. family with probable autosomal dominant bulbospinal muscular atrophy with gynecomastia / E. Matsuura, Y. Hokezu, M. Nakagawa // *Rinsho Shinkeigaku.* – 1999. – Vol. 39, № 11. – P. 1135-1137.
17. Wilson J.D., Roehrbom C. Long-term consequences of castration in men: lessons from the Skoptzy and the eunuchs of the Chinese and Ottoman courts / J.D. Wilson, C. Roehrbom // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 1999. – Vol. 84, № 12. – P. 4324-4331.
18. Sader M.A. Oestradiol improves arterial endothelial function in healthy men receiving testosterone / M.A. Sader, R.J. McCredie, K.A. Griffiths // *Clin. Endocrinol. (Oxf).* – 2001. – Vol. 54, № 2. – P. 175-181.
19. Aguirre M.A. Gynecomastia and sexual impotence associated with methotrexate treatment / M.A. Aguirre, A. Velez, M. Romero, E. Collemtes // *J Rheumatol.* – 2002. – Vol. 29, № 8. – P. 1793-1794.

20. Hugues F.C. Drug-induced gynaecomastia / F.C. Hugues, C. Gourlot, C. Le Jeune // *Ann. Med. Interne (Paris)*. – 2000. – Vol. 151, № 1. – P. 10-17.
21. O'Sullivan A.J. Anabolic-androgenic steroids: medical assessment of present, past and potential users / A.J. O'Sullivan, M.C. Kennedy, J.H. Casey [et al.] // *Med. J. Aust.* – 2000. – Vol. 173, № 6. – P. 323-327.
22. de Luis D.A. Anabolic steroids and gynecomastia. Review of the literature / D.A. de Luis, R. Aller, L.A. Cuellar // *An. Med. Interna.* – 2001. – Vol. 18, № 9. – P. 489-491.
23. Calzada L. Measurement of androgen and estrogen receptors in breast tissue from subjects with anabolic steroid- dependent gynecomastia / L. Calzada, J. Torres-Calleja, J.M. Martinez, N. Pedron // *Life Sci.* – 2001. – Vol. 69, № 13. – P. 1465-1469.
24. Collazos J. Serum prolactin concentrations in patients infected with human immunodeficiency virus / J. Collazos, S. Ibarra, E. Martinez, J. Mayo // *HIV Clin. Trials.* – 2002. – Vol. 3, № 2. – P. 133-138.
25. Pantanowitz L. Pathology of the breast associated with HIV/AIDS / L. Pantanowitz, J.L. Connolly // *Breast J.* – 2002. – Vol. 8, № 4. – P. 234-243.
26. Franco A. Experience at a branch center of the National HIV Protease Inhibitor Registry / A. Franco, L. Aprea, A. Geraci [et al.] // *Infez. Med.* – 2001. – Vol. 9, № 3. – P. 170-175.
27. Qazi N. Diagnosis and management of male breast enlargement in patients with HIV/AIDS / N. Qazi, J. Morlese, D.M. King // *AIDS Read.* – 2000. – Vol. 10, № 12. – P. 703-708.
28. Giordano S.H. Breast Cancer in Men / S.H. Giordano, A.U. Buzdar, G.N. Hortobagyi // *Ann. Intern. Med.* – 2002. – Vol. 137, № 8. – P. 678-687.
29. Meguerditchian A.N. Male breast carcinoma / A.N. Meguerditchian, M. Falardeau, G. Martin // *Can. J. Surg.* – 2002. – Vol. 45, № 4. – P. 296-302.
30. Olsson H. Male gynecomastia and risk for malignant tumours-a cohort study / H. Olsson, A. Bladstrom, P. Aim // *BMC Cancer.* – 2002. – Vol. 2, № 1. – P. 26.
31. Pensler J.M. Estrogen and progesterone receptors in gynecomastia / J.M. Pensler, B.L. Silverman, J. Sanghavi [et al.] // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2000. – Vol. 106, № 5. – P. 1011-1013.
32. Daniels I.R. Testicular tumours presenting as gynaecomastia / I.R. Daniels, G.T. Layer // *Eur. J. Surg.* – 2001. – Vol. 167, № 12. – P. 885-892.
33. Siddiqui M.T. Breast masses in males: multi-institutional experience on fine-needle aspiration / M.T. Siddiqui, M.F. Zakowski, R. Ashfaq, S.Z. Ali // *Diagn. Cytopathol.* – 2002. – Vol. 26, № 2. – P. 87-91.
34. Rosen D.S. Question From the Clinician: Adolescent Gynecomastia / D.S. Rosen // *Pediatr. Rev.* – 2003. – Vol. 24, № 9. – P. 317-319.
35. Kauf E. Gynecomastia in childhood. Pathological causes unusual but serious / E. Kauf // *Fortschr Med.* – 1998. – Vol. 116, № 35-36. – P. 23-26.
36. Lazala C. Pubertal gynecomastia / C. Lazala, P. Saenger // *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* – 2002. – Vol. 15, № 5. – P. 553-560.
37. Bergada I. Serum inhibin B concentration in a prepubertal boy with gynecomastia and Peutz-Jeghers syndrome / I. Bergada, K. Del Toro, O. Katz [et al.] // *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* – 2000. – Vol. 13, № 1. – P. 101-103.
38. Watanabe T. Estrogen secreting adrenal adenocarcinoma in an 18-month-old boy: aromatase activity, protein expression, mRNA and utilization of gonadal type promoter / T. Watanabe, T. Yasuda, H. Noda [et al.] // *Endocr. J.* – 2000. – Vol. 47, № 6. – P. 723-730.
39. Gunhan-Bilgen I. Male breast disease: clinical, mammographic, and ultrasonographic features / I. Gunhan-Bilgen, H. Bozkaya, E.E. Ustun, A. Memis // *Eur. J. Radiol.* – 2002. – Vol. 43, № 3. – P. 246-255.
40. Shoker B.S. Oestrogen receptor expression in the normal and pre-cancerous breast / B.S. Shoker, C. Jarvis, D.R. Sibson [et al.] // *J. Pathol.* – 1999. – Vol. 188, № 3. – P. 237-244.
41. Sasano H. Aromatase and steroid receptors in gynecomastia and male breast carcinoma: an immunohistochemical study / H. Sasano, M. Kimura, S. Shizawa [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 1996. – Vol. 81, № 8. – P. 3063-3067.
42. Gill K. Overexpression of aromatase in transgenic male mice results in the induction of gynecomastia and other biochemical changes in mammary glands / K. Gill, N. Kirma, R.R. Tekmal // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* – 2001. – Vol. 77, № 1. – P. 13-18.
43. Li X. Mammary gland development in transgenic male mice expressing human P450 aromatase / X. Li, A. Warri, S. Makela [et al.] // *Endocrinology.* – 2002. – Vol. 43, № 10. – P. 4074-4083.

44. Mandava U. Aromatase overexpression transgenic mice model: cell type specific expression and use of letrozole to abrogate mammary hyperplasia without affecting normal physiology / U. Mandava, N. Kirma, R.R. Tekmal // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* – 2001. – Vol. 79, № 1-5. – P. 27-34.
45. Dobs A.S. Pharmacokinetics, Efficacy, and Safety of a Permeation-Enhanced Testosterone Transdermal System in Comparison with Bi-Weekly Injections of Testosterone Enanthate for the Treatment of Hypogonadal Men / A.S. Dobs, A.W. Meikle, S. Arver [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 1999. – Vol. 84, № 10. – P. 3469-3478.
46. Gambacorti-Passerini C. Gynaecomastia in men with chronic myeloid leukaemia after imatinib / C. Gambacorti-Passerini, L. Tomaghi, F. Cavagnini [et al.] // *Lancet.* – 2003. – Vol. 361, № 9373. – P. 1954-1956.
47. Chowdhury A.R. Effect of pharmacological agents on male reproduction / A.R. Chowdhury // *Adv. Contracept. Deliv. Syst.* – 1987. – Vol. 3, № 4. – P. 347-352.
48. Brody S.A. Epidemic of gynecomastia among haitian refugees: exposure to an environmental antiandrogen / S.A. Brody, D.L. Loriaux // *Endocr. Pract.* – 2003. – Vol. 9, № 5. – P. 370-375.
49. Fellner E.I. Prepubertal gynecomastia: indirect exposure to estrogen cream / E.I. Fellner, P.C. White // *Pediatrics.* – 2000. – Vol. 105, № 4. – P. 55.
50. Satoh T. Studies on the Interactions between Drug and Estrogen. II. On the Inhibitory Effects of 29 Drugs Reported to Induce Gynecomastia on the Oxidation of Estradiol at C-2 or C-17 / T. Satoh, H. Munakata, K. Fujita // *Biol. Pharm. Bull.* – 2003. – Vol. 26, № 5. – P. 695-700.
51. Forloni F. Pituitary prolactin-secreting macroadenoma combined with bilateral breast cancer in a 45-year-old male / F. Forloni, M. Giovilli, C. Peci [et al.] // *J. Endocrinol. Invest.* – 2001. – Vol. 24, № 6. – P. 454-459.
52. Rosato F. Hyperprolactinemia: from diagnosis to treatment / F. Rosato, P. Garofalo // *Minerva Pediatr.* – 2002. – Vol. 54, № 6. – P. 547-552.
53. Ballerini P. Hormones in male breast cancer / P. Ballerini, C. Recchione, A. Cavalleri [et al.] // *Tumori.* – 1990. – Vol. 76, № 1. – P. 26-28.
54. Volm M.D. Male breast cancer / M.D. Volm // *Curr. Treat. Options Oncol.* – 2003. – Vol. 4, № 2. – P. 159-164.

## **RISK FACTORS, ROLE OF STEROID HORMONES AND THEIR RECEPTORS IN DEVELOPMENT OF THE GYNECOMASTIA**

*Vovchuk I.L.*

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

In the review data of literature on the frequency of occurrence, risk factors and a role of steroid hormones and their endogenic receptors in development of a gynecomastia in men are generalized.

Gynecomastia – a benign tumor of chest gland at men. Frequency of occurrence of a gynecomastia of chest gland at men makes 32,0–87,3 % among other good-quality new growths at men and is most widespread in pubertatny age and in an andropause. The most widespread is the idiopathic form of a gynecomastia which is connected with age by frustration of endocrine system, action of medicinal preparations, a hypogonadism, other accompanying diseases and which meets at men at pubertate age and in an andropause. The probability of development of an idiopathic gynecomastia increases with increase in body weight and thickness of a hypodermic fatty layer.

Risk factors of development of a gynecomastia in men are: puberty age, testicular frustration, action of medicinal preparations, increase in body weight and thickness of a

hypodermic fatty layer, trisomy 4 chromosomy, Klyaynfelter's syndrome, ratios of androgens and estrogen. The gynecomastia can be caused by diseases: giperprolaktinemia, complete and tolerance to androgens, deficiency of a 17-hydroksysteroid-reductase, castration, treatment by high doses of oestradiol, an anti-estrogen, neuroleptics and anabolics. The gynecomastia meets at 21-52% of the athletes using steroid anabolics and the probability of development of a tumor is higher at the chronic use of high doses of anabolics.

At a gynecomastia a proliferation of ER+ of cages is observed, the increase in a share of cages, at the same time which expressing ER and a factor of a proliferation of Ki67 is noted. The high maintenance of ER correlates with low the maintenance of an estrogen, as well as at women in the period of a postmenopause. High degree of positivity of a gynecomastia on receptors of steroid hormones is observed at an induction of synthesis, or at the intensive use of these hormones. Can be the cause of development of ER+ of a gynecomastia or tolerance to androgens, or violation of a ratio between an estrogen and androgens.

At patients with not an idiopathic gynecomastia in blood serum the content of the free testosterone, luteinizing and/or folliculle-stimulating hormones is lowered and the maintenance of an estrogen and prolactinum is raised. In tumoral fabric the maintenance of steroid hormones that leads to an estrogen stimyleting proliferation of cells of tumor increases.

The idiopathic gynecomastia is not bound to risk of malignant regeneration of chest gland in the first two years after emergence. The gynecomastia accompanying Klyaynfelter's syndrome is bound to high risk of a malignancy.

**Keywords:** gynecomastia, tumor, hormones, blood serum, mamalian gland.

#### References

1. Rogers S., Day C.A., Fox S.B. Expression of cathepsin D and estrogen receptor in male breast carcinoma, *Hum. Pathol.*, **24**, 2 (1993).
2. Ersoz H., Onde M. E., Terekeci H., Kurtoglu S., Tor H., Causes of gynaecomastia in young adult males and factors associated with idiopathic gynaecomastia, *Int. J. Androl.*, **25**, 5 (2002).
3. Geschickter C.F., Lewis D., Hartman C.G., Tumors of the breast related to the oestrin hormone, *Am. J. Cancer.*, **21** (1934).
4. Rapetti S., Francia G., Iacono C., Martignoni G., Contessi G., Brunelli M, Galvanin F., Serio G., An unusual case of Cushing's syndrome due to ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia, *Chir. Ital.*, **55**, 2 (2003).
5. Cavailles V., Augereau P., Garcia M., Rochefort H., Estrogens and growth factors induce the mRNA of the 52 K-pro-cathepsin D secreted by breast cancer cells, *Nucl. Acids Res.*, **16**, 5 (1989).
6. Mathur R., Braunstein G.D., Gynecomastia: pathomechanisms and treatment strategies, *Horm. Res.*, **48**, 3 (1997).
7. Delgrange E., Mailer D., Donckier J., Toumiaire J., Influence of age on the clinical presentation of prolactinomas in male patients, *Gerontology.*, **45**, 3 (1999).
8. Braunstein G.D., Aromatase and gynecomastia, *Endocr. Relat. Cancer.*, **6**, 2 (1999).
9. Sher E.S., Migeon C.J., Berkovitz G.D., Evaluation of boys with marked breast development at puberty, *Clin. Pediatr. (Phila.)*, **37**, 6 (1998).
10. Kuhn J.M., Cosecretion of estrogen and inhibin B by a feminizing adrenocortical adenoma: impact on gonadotropin secretion, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **87**, 5 (2002).
11. Piolat C., Dyon J. F., Chavanis N., Jacquier C., Durand C., Pasquier D., Testicular Leydig cell hyperplasia in children, *Prog. Urol.*, **13**, 1 (2003). – P. 110-114.
12. Venara M., Rey R., Bergada I., Mendilaharsu H., Campo S., Chemes H., Sertoli cell proliferations of the infantile testis: an intratubular form of Sertoli cell tumor?, *Am. J. Surg. Pathol.*, **25**, 10 (2001).
13. Weinstein S. P., Conant E. F., Orel S. G., Lawton T. J., Acs G., Diabetic mastopathy in men: imaging findings in two patients, *Radiology.*, **219**, 3 (2001).

14. Burhano R. R., Neto J. B., Philbert P., Lemos J. A., Bahia M., Casartelli C., Trisomy 4 in a case of gynecomastia, *Cancer Genet. Cytogenet.*, **117**, 2 (2000).
15. Shoker B. S., Jarvis C., Clarke R. B., Anderson E., Munro C., Davies M. P. A., Sibson D. R., Sloane J. P., Abnormal regulation of the oestrogen receptor in benign breast lesions, *J. Clin. Pathol.*, **53**, 10 (2000).
16. Matsuura E., Hokezu Y., Nakagawa M., Arimura H., Nagamatsu K., A family with probable autosomal dominant bulbospinal muscular atrophy with gynaecomastia, *Rinsho Shinkeigaku.*, **39**, 11 (1999).
17. Wilson J.D., Roehrbom C., Long-term consequences of castration in men: lessons from the Skoptzy and the eunuchs of the Chinese and Ottoman courts, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **84**, 12 (1999).
18. Sader M. A., McCredie R. J., Griffiths K. A., Wishart S. M., Handelsman D. J., Celemajer D. S., Oestradiol improves arterial endothelial function in healthy men receiving testosterone, *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, **54**, 2 (2001).
19. Aguirre M.A., Velez A., Romero M., Colicmtes E., Gynecomastia and sexual impotence associated with methotrexate treatment, *J Rheumatol.*, **29**, 8 (2002).
20. Hugues F.C., Gourlot C., Le Jeunne C. Drug-induced gynaecomastia, *Ann. Med. Interne (Paris)*, **151**, 1 (2000).
21. O'Sullivan A. J., Kennedy M. C, Casey J. H., Day R. O., Corrigan B., Wodak A. D., Anabolic-androgenic steroids: medical assessment of present, past and potential users, *Med. J. Aust.*, **173**, 6 (2000).
22. de Luis D. A., Aller R., Cuellar L. A., Terroba C., Romero E., Anabolic steroids and gynecomastia., *Review of the literature, An. Med. Interna.*, **18**, 9 (2001).
23. Calzada L., Torres-Calleja J., Martinez J.M., Pedron N., Measurement of androgen and estrogen receptors in breast tissue from subjects with anabolic steroid- dependent gynecomastia, *Life Sci.*, **69**, 13 (2001).
24. Collazos J., Ibarra S., Martinez E., Mayo J. Serum prolactin concentrations in patients infected with human immunodeficiency virus HIV, *Clin. Trials.*, **3**, 2 (2002).
25. Pantanowitz L., Connolly J.L., Pathology of the breast associated with HIV/AIDS, *Breast J.*, **8**, 4 (2002).
26. Franco A., Aprea L., Geraci A., Manzillo E., Pizzella T., Simioli F., Mongirulli A., Izzo CM., Experience at a branch center of the National HIV Protease Inhibitor Registry, *Infez. Med.*, **9**, 3 (2001).
27. Qazi N., Morlese J., King D. M, Ahmad R., Nelson M., Diagnosis and management of male breast enlargement in patients with HIV/AIDS, *AIDS Read.*, **10**, 12 (2000).
28. Giordano S.H., Buzdar A.U., Hortobagyi G.N. Breast Cancer in Men, *Ann. Intern. Med.*, **137**, 8 (2002).
29. Meguerditchian A.N., Falardeau M., Martin G., Male breast carcinoma, *Can. J. Surg.*, **45**, 4 (2002).
30. Olsson H., Bladstrom A., Aim P. Male gynecomastia and risk for malignant tumours-a cohort study, *BMC Cancer.*, **2**, 1 (2002).
31. Pensler J. M., Silverman B. L., Sanghavi J., Goolsby C., Speck G., Brizio-Molteni L., Molteni A., Estrogen and progesterone receptors in gynecomastia, *Plast. Reconstr. Surg.*, **106**, 5 (2000).
32. Daniels I.R., Laver G.T., Testicular tumours presenting as gynaecomastia, *Eur. J. Surg.*, **167**, 12 (2001).
33. Siddiqui M.T., Zakowski M.F., Ashfaq R., Ali S.Z., Breast masses in males: multi-institutional experience on fine-needle aspiration, *Diagn. Cytopathol.*, **26**, 2 (2002).
34. Rosen D.S., Question From the Clinician: Adolescent Gynecomastia, *Pediatr. Rev.*, **24**, 9 (2003).
35. Kauf E., Gynecomastia in childhood. Pathological causes unusual but serious, *Fortschr Med.*, **116**, 35-36 (1998).
36. Lazala C., Saenger P., Pubertal gynecomastia, *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.*, **15**, 5 (2002).
37. Bergada I., Del Toro K., Katz O., Chemes H., Campo S., Serum inhibin B concentration in a prepubertal boy with gynecomastia and Peutz-Jeghers syndrome, *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.*, **13**, 1 (2000).
38. Watanabe T., Yasuda T., Noda H., Wada K., Kazukawa I., Someya T., Minamitani K., Minagawa M, Wataki K., Matsunaga T., Ohnuma N., Kohno Y, Harada N., Estrogen secreting adrenal adenocarcinoma in an 18-month-old boy: aromatase activity, protein expression, mRNA and utilization of gonadal type promoter, *Endocr. J.*, **47**, 6 (2000).
39. Gunhan-Bilgen I., Bozkaya H., Ustun E.E., Memis A., Male breast disease: clinical, mammographic, and ultrasonographic features, *Eur. J. Radiol.*, **43**, 3 (2002).
40. Shoker B. S., Jarvis C., Sibson D. R, Walker C., Sloane J. P., Oestrogen receptor expression in the normal and pre-cancerous breast, *J. Pathol.*, **188**, 3(1999).
41. Sasano H., Kimura M., Shizawa S., Kimura N., Nagura H., Aromatase and steroid receptors in gynecomastia and male breast carcinoma: an immunohistochemical study, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **81**, 8 (1996).

42. Gill K., Kirma N., Tekmal R.R., Overexpression of aromatase in transgenic male mice results in the induction of gynecomastia and other biochemical changes in mammary glands, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **77**, 1 (2001).
43. Li X., Warri A., Makela S., Ahonen T., Streng T., Santi R., Poutanen M., Mammary gland development in transgenic male mice expressing human P450 aromatase, *Endocrinology.*, **43**, 10 (2002).
44. Mandava U., Kirma N., Tekmal R.R., Aromatase overexpression transgenic mice model: cell type specific expression and use of letrozole to abrogate mammary hyperplasia without affecting normal physiology, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **79**, 1-5 (2001).
45. Dobs A. S., Meikle A. W, Arver S., Sanders S. W., Caramelli K. E., Mazer N. A., Pharmacokinetics, Efficacy, and Safety of a Permeation-Enhanced Testosterone Transdermal System in Comparison with Bi-Weekly Injections of Testosterone Enanthate for the Treatment of Hypogonadal Men, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **84**, 10 (2001).
46. Gambacorti-Passerini C., Tomaghi L., Cavagnini F., Rossi P., Pecori-Giraldi F., Mariani L., Cambiaghi N., Pogliani E., Comeo G., Gnessi L., Gynaecomastia in men with chronic myeloid leukaemia after imatinib, *Lancet.*, **361**, 9373 (2003).
47. Chowdhury A.R., Effect of pharmacological agents on male reproduction, *Adv. Contracept. Deliv. Syst.*, **3**, 4 (1987).
48. Brody S.A., Loriaux D.L. Epidemic of gynecomastia among haitian refugees: exposure to an environmental antiandrogen, *Endocr. Pract.*, **9**, 5 (2003).
49. Fellner E.I., White P.C., Prepubertal gynecomastia: indirect exposure to estrogen cream, *Pediatrics.*, **105**, 4 (2000).
50. Satoh T., Munakata H., Fujita K., Itoh S., Itoh S., Kamataki T., Yoshizawa I., Studies on the Interactions between Drug and Estrogen. II. On the Inhibitory Effects of 29 Drugs Reported to Induce Gynecomastia on the Oxidation of Estradiol at C-2 or C-17, *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 5 (2003).
51. Forloni F., Giovilli M., Pecis C., Bortolani E., Preziosi A., Barzaghi M. E., Corti D., Beck-Peccoz P., Pituitary prolactin-secreting macroadenoma combined with bilateral breast cancer in a 45-year-old male, *J. Endocrinol. Invest.*, **24**, 6 (2001).
52. Rosato F., Garofalo P., Hyperprolactinemia: from diagnosis to treatment, *Minerva Pediatr.*, **54**, 6 (2002).
53. Ballerini P., Recchione C., Cavalleri A., Moneta R., Saccozzi R., Sereeto G., Hormones in male breast cancer, *Tumori.*, **76**, 1 (1990).
54. Volm M.D., Male breast cancer, *Curr. Treat. Options Oncol.*, **4**, 2 (2003).

Поступила в редакцию 28.10.2014 г.

УДК 57.083.3 + 616-71 + 543.9

## БІОАНАЛІТИЧНА ВАЛІДАЦІЯ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ ДЛЯ ЯКІСНОГО (НАПІВКІЛЬКІСНОГО) ВИЗНАЧЕННЯ АНТИТІЛ КЛАСУ IGA ДО *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

Галкін О.Ю.<sup>1</sup>, Горшунів Ю.В.<sup>2</sup>, Бесараб О.Б.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут», Київ,  
Україна

<sup>2</sup>Науково-дослідний та конструкторсько-технологічний інститут міського господарства,  
Київ, Україна  
E-mail: alexfbt@mail.ru

Метою даного дослідження було науково-методичне обґрунтування процедури валідації засобу для серологічної *in vitro* діагностики на прикладі імуноферментного набору для якісного (напівкількісного) визначення специфічних антитіл класу IgA до *Chlamydia trachomatis*. Валідаційні характеристики (прецизійність, діагностична та аналітична специфічність, діагностична чутливість, відносна лінійність) визначали як на момент випуску діагностичного набору, так і на момент закінчення терміну придатності (як елемент дослідження стабільності). Показники діагностичної чутливості та специфічності, встановлені за допомогою внутрішньовиробничої панелі сироваток (20 позитивних та 50 негативних) склали 100%. Присутність у досліджуваних зразках антитіл інших класів до збудника уrogenітального хламідіозу не впливала на коректність аналізу щодо визначення специфічних антитіл класу IgA. Лінійність методики була задовільною. Збіжність результатів аналізу знаходилася у межах від 3,4% до 6,8%, а внутрішньолабораторна прецизійність – від 4,0% до 7,3%, залишаючись прийнятною ( $\leq 10\%$ ) як на момент випуску, так і на момент закінчення терміну придатності. Метод імуноферментного аналізу визнано валідованим, а діагностичний набір стабільним упродовж 1 року.

**Ключові слова:** імуноферментний аналіз, валідація, антитіла, *Chlamydia trachomatis*.

### ВСТУП

Оцінка придатності аналітичних методик є одним із найважливіших елементів системи забезпечення якості продукції фармацевтичної та біотехнологічної галузей. Валідація аналітичних методик являє собою процедуру експериментального доведення того, що методика придатна для розв'язання поставлених завдань [1]. Слід зазначити, що засоби для серологічної *in vitro* діагностики мають низку особливостей та відмінностей від лікарських засобів, через що підходи до їх біоаналітичної стандартизації мають відрізнятися від аналогічних підходів, що застосовують у випадку лікарських засобів [2]. У наших попередніх дослідженнях проведено аналіз вимог національних та міжнародних нормативних документів щодо якості та безпечності медичних виробів для діагностики *in vitro* та обговорено можливість часткового застосування рекомендацій Державної фармакопеї України до даного виду продукції [2]. Нами було визначено, що параметрами біоаналітичної стандартизації та валідаційними характеристиками для якісних (напівкількісних)

засобів для серологічної діагностики можуть бути прецизійність (збіжність, внутрішньолабораторна прецизійність та відтворюваність), діагностична та аналітична специфічність, діагностична чутливість, а для кількісних – додатково правильність (точність), лінійність, аналітична чутливість та діапазон застосування. З огляду на відсутність національних рекомендацій щодо проведення валідації біоаналітичних методик, що використовуються у серологічній *in vitro* діагностиці, ми вважаємо вкрай актуальним питання створення науково-методичних рекомендацій щодо валідації імуноферментних наборів для якісного та кількісного визначення біоаналітів.

Мета роботи – обґрунтування процедури та проведення валідації імуноферментного аналізу (ІФА), що призначений для якісного (напівкількісного) визначення специфічних IgA-антитіл до *Ch. trachomatis*.

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Дана робота є фрагментом науково-дослідної роботи «Науково-методичне обґрунтування параметрів аналітичної якості та стандартизації виробництва засобів для серологічної діагностики інфекційних та неінфекційних захворювань», яка виконується на кафедрі промислової біотехнології НТУУ «КПІ».

*Діагностичні набори.* У роботі було загалом використано 3 дослідно-промислові серії набору, які досліджували відразу після виготовлення та через 1 рік – наприкінці строку придатності (як елемент дослідження стабільності набору).

*Панель сироваток.* Для проведення валідації використовували власне сформовану внутрішньовиробничу панель сироваток (ВВП). Позитивні зразки формували із сироваток крові пацієнтів, що містили антитіла класу IgG до *Ch. trachomatis* та мали позитивні результати полімеразної ланцюгової реакції при виявленні ДНК збудника в урогенітальному мазку. Такі сироватки досліджували із використанням діагностичних наборів «ХламиБест-С.trachomatis IgA», Вектор-Бест, Росія, та «Chlamydien-IgA-rELISA medac», Medac, Німеччина. Для включення до ВВП відбирали лише ті зразки, які давали позитивні результати за всіма видами досліджень. Негативні зразки не містили специфічних до *Ch. trachomatis* IgA-антитіл. Серед негативних зразків було відібрано 5 сироваток, які містили IgM-антитіла до збудника урогенітального хламідіозу, та 15 зразків, що були позитивними на відповідні IgG-антитіла (дані сироватки використовували для оцінки аналітичної чутливості аналізу).

*Непрямий варіант ІФА.* Рекомбінантний білок зовнішньої мембрани *Ch. trachomatis* сорбували в 0,02 М карбонат-бікарбонатному буфері на 96-лункові планшети для твердофазного ІФА. Планшет інкубували протягом 12 год при 4 °С, тричі відмивали фосфатно-сольовий буфер (ФСБ) з додаванням 0,05% твін-20 (ФСБТ), рН 7,2–7,4 та витримували у розчині БСА (10 мг/мл в ФСБ) 1 год при 37 °С. Планшети висушували у вакуум-втяжній шафі та герметично запаювали у поліетиленові пакети. У такому вигляді планшети зберігалися до постановки аналізу. Перед постановкою аналізу лунки планшету заповнювали 90 мкл буферного розчину для розведення сироваток (0,05 М трис-НСІ буфер, рН 8,0, 0,15 М NaCl, 5 мМ ЕДТА, 0,5 мг/мл БСА, 0,2 % Tween-20) та 30 мкл досліджуваного

зразку сироватки (для розведення 1:4); суміш інкубували 60 хв за температури 37 °С. Після інкубації лунки планшету тричі промивали по 300 мкл ФСБТ та вносили розчин кон'югату моноклональних антитіл до IgA людини із ферментом пероксидазою хрому; суміш інкубували 30 хв за температури 37 °С. Після інкубації лунки планшету чотири рази промивали по 300 мкл ФСБТ та вносили субстратно-хромогенний розчин (3,3',5,5'-тетраметилбензидин, 0,003 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,15 М цитратний буфер, рН 5,0). Після зупинки ферментативної реакції вимірювали оптичну густину (ОГ) розчину у лунках при довжині хвилі 450 нм.

*Математичні (статистичні) методи.* Статистичну обробку експериментальних даних проводили із використанням відповідних рекомендацій [1,3,4], а також програмного комплексу Microsoft Excel.

Рівень граничного значення (ГЗ) розраховували за формулою (1)

$$ГЗ = ОГ_{сер} + 3\sigma, \quad (1)$$

де  $ОГ_{сер}$  – значення середньої ОГ негативних зразків,  $\sigma$  – середньоквадратичне відхилення (дисперсія) значень ОГ негативних сироваток [5].

Процент позитивності (ПП) розраховували за формулою (2)

$$ПП = ГЗ / ОГ_{ст.К+}, \quad (2)$$

де ГЗ – граничне значення,  $ОГ_{ст.К+}$  – ОГ певного позитивного стандарту.

Коефіцієнт варіації (CV) результатів аналізу розраховували за формулою (3)

$$CV = SD \times 100\% / X_{сер}, \quad (3)$$

де SD – стандартне відхилення певної величини,  $X_{сер}$  – середнє арифметичне значення певної величини.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

*Оцінка чутливості та специфічності аналізу.* Як відомо діагностична специфічність (ДС) характеризує спроможність методу визначати лише той компонент, для виявлення котрого він призначений, тобто характеризує здатність відповідного засобу реєструвати мінімальну кількість хибнопозитивних результатів. У той час як діагностична чутливість (ДЧ) являє собою показник, який характеризує здатність методу виявляти максимальну кількість дійснопозитивних зразків. У випадку дослідження на наявність аналітів інфекційного походження ДЧ відображає долю інфікованих осіб, котрі можуть бути виявлені при використанні даного аналізу [6]. Визначення ДЧ та ДС імуноферментних наборів проводять із використанням різноманітних панелей сироваток: негативних, позитивних низькотитражних та сероконверсійних. Такі панелі сироваток виготовляються у вигляді комерційного продукту та використовуються багатьма розробниками і виробниками ІФА-наборів (наприклад, SeraCare Life Sciences/Boston Biomedical Inc., США, Науковий центр експертизи засобів медичного застосування, Росія, Медико-біологічний Союз, Росія) або створюються виробниками самостійно для власного використання (так звані внутрішньовиробничі панелі сироваток). Зважаючи на те, що панелі сироваток для оцінки діагностичної якості ІФА-наборів для діагностики урогенітального хламідіозу не є поширеними, ми були змушені формувати власну ВВП (20 позитивних та 50 негативних зразків).

Ключовим моментом у визначенні ДЧ та ДС якісного (напівкількісного) ІФА є встановлення рівня граничного значення (Cut-off). Існують різні методологічні підходи для розрахунку ГЗ. Більш універсальним підхід адресується до використання формули (1) [6], у той же час інші дослідники встановлюють даний показник як частку (10...20%) від максимального результату, отриманого при тестуванні високотитражних сироваток [10], використовуючи такий показник як процент позитивності (ПП). Кількісний розподіл досліджуваних сироваток за діапазонами ПП представлено на рис. 1 (дослідження проводили із набором дослідно-промислової серії 0113 у першій місяць після виготовлення). ГЗ, розраховане за формулою (1), склало 0,156 оптичних одиниць (о.о.), що відповідає 8 % ПП. Результати тестування сироваток ВВП оцінювали залежно від різного рівня ГЗ та розраховували відповідні значення ДЧ та ДС (рис. 2). Отримані дані свідчать про те, що встановлення ГЗ на рівні 8 % ПП забезпечує найкращі значення для обох показників ДЧ та ДС (100%).

Аналітичну специфічність (АС) аналізу оцінювали із використанням 15 зразків ВВП, які не містили IgA-антитіла до збудника уrogenітального хламідіозу: 5 сироваток, які містили IgM-антитіла, та 15 зразків, що були позитивними на IgG-антитіла. Дані IgM-негативні зразки використовували для розведення позитивних сироваток (як альтернативу розчину для розведення сироваток) та досліджували коефіцієнти варіації в межах однієї постановки аналізу (CV) у 4-х повторях для різних зразків. Показник CV знаходився у межах від 3% до 8%, що є цілком задовільним, та дає можливість стверджувати, що присутність у досліджуваних зразках антитіл аналогічної специфічності інших класів не впливає на ДС (АС є прийнятною).

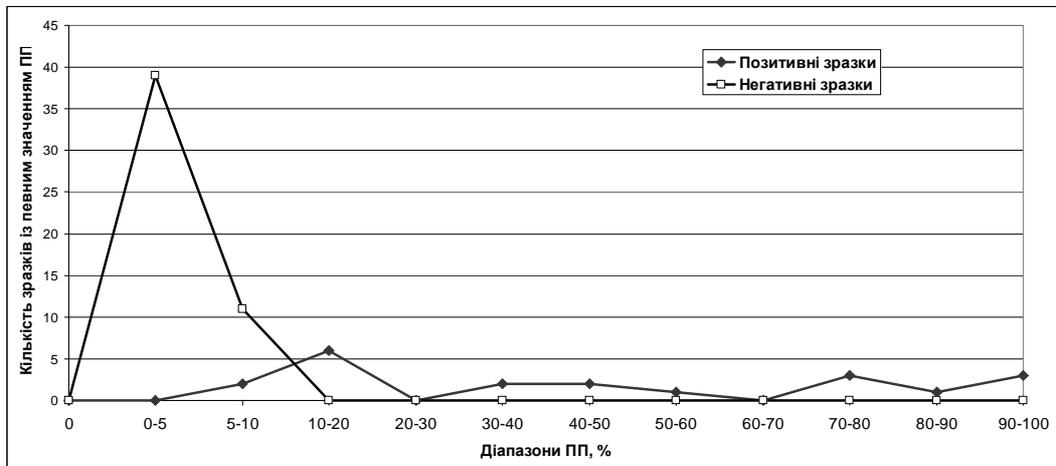


Рис. 1. Розподіл досліджуваних сироваток ВВП за діапазонами проценту позитивності

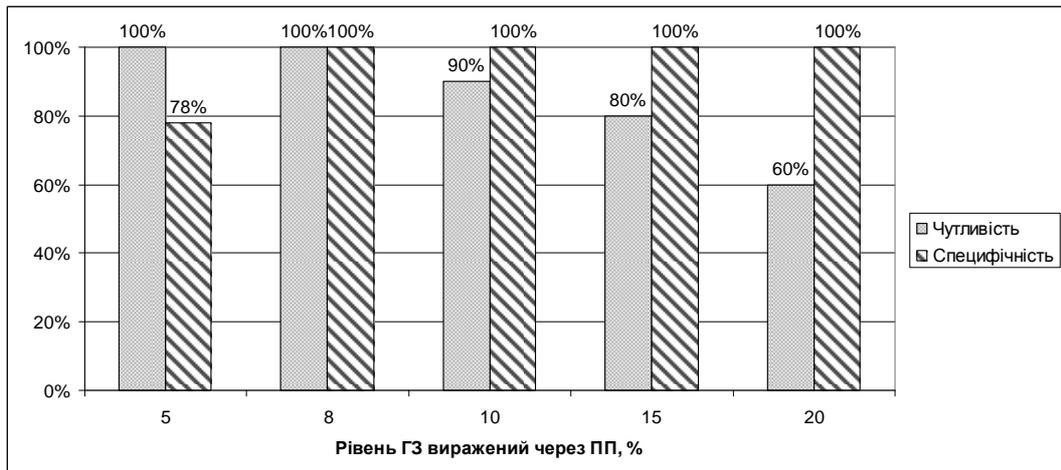


Рис. 2. Залежність діагностичних чутливості та специфічності аналізу від встановленого рівня ГЗ

Аналогічні дослідження із визначення ДЧ, ДС та АС проводили із набором серії 0113 через 1 рік після його виготовлення (на момент закінчення строку придатності) для підтвердження його стабільності. Було отримано наступні результати: ГЗ становило 0,169 о.о. (9 % ПП), ДЧ та ДС склали по 100 %, при оцінці АЧ аналізу CV не перевищував 10 %. Таким чином, валідаційні характеристики на момент закінчення терміну придатності залишилися цілком прийнятними.

*Оцінка межі виявлення та лінійності.* Очевидно, що для якісного (напівкількісного) аналізу не можливо встановити абсолютну межу виявлення (аналітичну чутливість), проте ми пропонуємо оцінити даний показник шляхом титрування низькотитражних позитивних сироваток. На рис. 3 представлено результати титрування трьох позитивних зразків ВВП, у порівнянні із аналогічним дослідженням трьох негативних сироваток. Дві із трьох позитивних сироваток засвідчили позитивний результат лише у розведенні 1 : 4 (зразки 1 та 2), одна давала позитивний результат ще й у розведенні 1 : 8 (зразок 8).

Лінійність аналізу оцінювали при титруванні високотитражних сироваток ВВП, використовуючи отримані дані для отримання рівняння лінійної регресії (рис. 4). Відповідні дослідження проводили із набором дослідно-промислової серії 0113 у першій місяць після виготовлення. Коефіцієнти нахилу графіку лінійної регресії знаходилися у діапазоні 1,473-1,698, що є прийнятним для якісного аналізу [1, 3, 8]. Коефіцієнти кореляції ( $r$ ) між експериментальними та теоретичними значеннями ОГ порівнювали із критичним значенням для різних рівнів достовірності [4]. Отримані результати (табл. 1) свідчать про прийнятний рівень відповідності експериментальних даних та результатів ОГ, розрахованих за рівнянням лінійної регресії для трьох досліджених зразків сироваток. Результати титрування високотитражних сироваток та оцінки лінійності на момент закінчення терміну придатності імуноферментного набору представлені у табл. 2 й свідчать про збереження задовільного рівня досліджуваних характеристик через рік зберігання

імуноферментного набору. Зазначимо також, що коефіцієнти кореляції між значеннями ОГ, отриманими в експерименті на момент випуску та на момент закінчення терміну придатності для досліджених сироваток знаходилися у діапазоні 0,996-0,999, що є додатковим свідченням задовільного рівня стабільності імуноферментного набору.

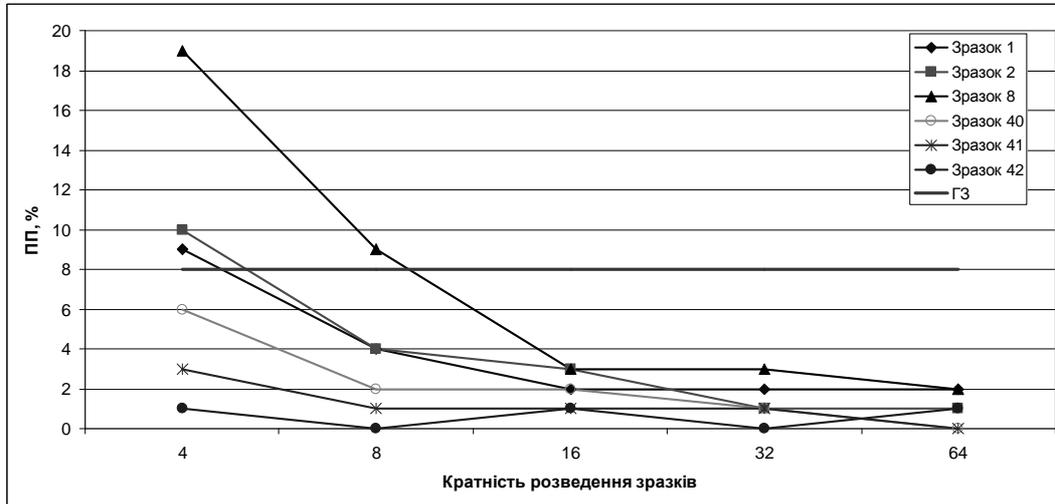


Рис. 3. Встановлення відносної аналітичної чутливості аналізу

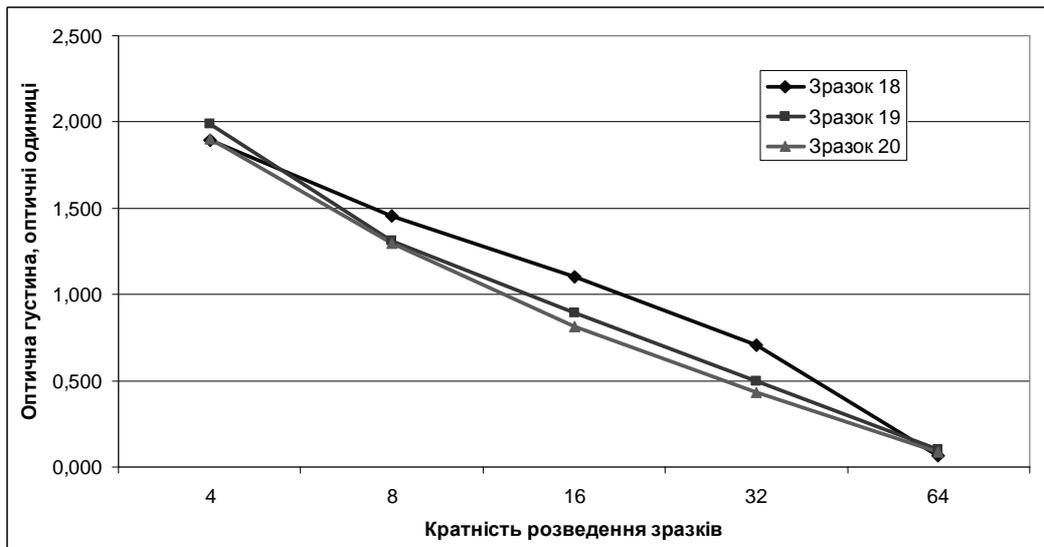


Рис. 4. Встановлення лінійності аналізу із використанням високотитражних сироваток на момент випуску імуноферментного набору

**Таблиця 1**  
**Результати титрування високотитражних сироваток та оцінка лінійності**  
**на момент випуску імуноферментного набору**

№ зразка	Значення ОГ* для різних розведень зразків сироваток					Рівняння лінійної регресії	Коефіцієнт кореляції $r$ та його рівень достовірності [4]
	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64		
18	1,895/ 1,598	1,455/ 1,497	1,100/ 1,296	0,705/ 0,895	0,062/ 0,091	$y = 1,731x - 0,028$	0,963 ( $p \leq 0,01$ )
19	1,988/ 1,500	1,311/ 1,399	0,891/ 1,198	0,495/ 0,795	0,098/ -0,009	$y = 1,621x - 0,027$	0,893 ( $p \leq 0,05$ )
20	1,902/ 1,376	1,100/ 1,279	0,812/ 1,298	0,429/ 0,695	0,085/ -0,083	$y = 1,552x - 0,026$	0,887 ( $p \leq 0,05$ )

\* Значення ОГ наведене у форматі експериментальне/теоретичне. Представлені середні арифметичні значення експериментальних значень ОГ за результатами досліджень у 5-и повторях.

**Таблиця 2**  
**Результати титрування високотитражних сироваток та оцінка лінійності**  
**на момент закінчення терміну придатності імуноферментного набору**

№ зразка	Значення ОГ* для різних розведень зразків сироваток					Рівняння лінійної регресії	Коефіцієнт кореляції $r$ та його рівень достовірності [4]
	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64		
18	1,906/ 1,578	1,364/ 1,474	1,118/ 1,264	0,642/ 0,845	0,259/ 0,008	$y = 1,683x - 0,026$	0,944 ( $p \leq 0,02$ )
19	1,972/ 1,520	1,354/ 1,411	0,888/ 1,193	0,466/ 0,756	0,184/ -0,116	$y = 1,629x - 0,027$	0,898 ( $p \leq 0,05$ )
20	1,881/ 1,404	1,208/ 1,304	0,825/ 1,104	0,415/ 0,705	0,115/ -0,093	$y = 1,507x - 0,025$	0,879 ( $p \leq 0,05$ )

\* Значення ОГ наведене у форматі експериментальне/теоретичне. Представлені середні арифметичні значення експериментальних значень ОГ за результатами досліджень у 5-и повторях.

*Визначення прецизійності аналізу.* Як відомо прецизійність може розглядатися на різних рівнях, зокрема: збіжність (intra assay variation) характеризує варіації при постановках аналізу за тих самих умов протягом невеликого проміжку часу; внутрішньолабораторна прецизійність (inter assay variation) враховує внутрішньолабораторні варіації; відтворюваність характеризує ступінь близькості результатів при міжлабораторному експерименті. У нашій роботі ми оцінювали: збіжність при дослідженні сироваток позитивного та негативного контролів в рамках однієї постановки у 4-х повторях на 4-х ІФА-планшетах, виражену через коефіцієнт варіації  $CV_{intra}$ ; внутрішньолабораторну прецизійність при дослідженні сироваток позитивного та негативного контролів в рамках 3-х постановок у різні дні різними операторами на різних серіях набору виражену через коефіцієнт варіації  $CV_{inter}$ . Результати відповідних експериментів представлені у табл. 3 та 4. Середне

**БІОАНАЛІТИЧНА ВАЛІДАЦІЯ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ...**

значення збіжності ( $CV_{intra}$ ) для досліджень на момент випуску склав 5,3 %, а на момент закінчення терміну придатності – 6,2 %. Внутрішньолабораторна прецизійність аналізу при використанні різних серій набору на момент випуску коливалася у межах від 3,3 % до 9,6 % (середнє значення  $CV_{inter}$  5,8 %), а на момент закінчення терміну придатності – від 2,5 % до 8,7 % (середнє значення  $CV_{inter}$  5,6 %). За різними рекомендаціями прийнятними є різні значення  $CV_{intra}$  та  $CV_{inter}$ : одні автори рекомендують встановлювати нормування даних показників як  $CV \leq 10\%$  [9], інші вважають прийнятними результати при не перевищенні даних показників межі у 20 % [8]. Отримані нами результати прецизійності аналізу свідчать про їх прийнятність як на момент випуску, так і на момент закінчення терміну придатності набору.

**Таблиця 3**

**Результати дослідження збіжності імуноферментного аналізу**

Планшет	ОГ у повторах	Середня ОГ для планшету	Середня ОГ для всіх планшетів	Стандартне відхилення	$CV_{intra}$
Для позитивного контролю					
На момент випуску					
1	1,115; 1,101; 1,108; 1,251	1,144	1,156	0,050	4,3%
2	1,221; 1,205; 1,101; 1,119	1,162			
3	1,122; 1,158; 1,160; 1,133	1,143			
4	1,209; 1,110; 1,166; 1,220	1,176			
На момент закінчення терміну придатності					
1	1,122; 1,118; 1,123; 1,241	1,151	1,171	0,073	6,2%
2	1,210; 1,204; 1,115; 1,214	1,186			
3	1,116; 1,167; 1,154; 1,066	1,126			
4	1,225; 1,109; 1,188; 1,366	1,222			
Для негативного контролю					
На момент випуску					
1	0,038; 0,036; 0,033; 0,035	0,036	0,037	0,002	5,5%
2	0,036; 0,039; 0,035; 0,037	0,037			
3	0,039; 0,040; 0,038; 0,035	0,038			
4	0,037; 0,034; 0,038; 0,039	0,037			
На момент закінчення терміну придатності					
1	0,036; 0,037; 0,031; 0,032	0,034	0,034	0,002	6,8%
2	0,037; 0,034; 0,032; 0,036	0,035			
3	0,032; 0,035; 0,038; 0,034	0,035			
4	0,033; 0,035; 0,031; 0,037	0,034			

**Таблиця 4**

**Результати дослідження внутрішньолaborаторної прецизійності імуноферментного аналізу**

Постановка/ серія набору	ОГ у повторях	Середня ОГ для постановки	Стандартне відхилення	CV <sub>intra</sub>	Середнє значення CV <sub>intra</sub>
Для позитивного контролю					
На момент випуску					
1 / 0113	1,115; 1,101; 1,108; 1,251	1,144	0,072	6,3%	4,5%
2 / 0213	1,154; 1,231; 1,162; 1,127	1,169	0,044	3,8%	
3 / 0313	1,266; 1,321; 1,352; 1,264	1,301	0,043	3,3%	
На момент закінчення терміну придатності					
1 / 0113	1,122; 1,118; 1,123; 1,241	1,151	0,060	5,2%	4,0%
2 / 0213	1,166; 1,214; 1,255; 1,137	1,193	0,052	4,4%	
3 / 0313	1,274; 1,216; 1,219; 1,268	1,244	0,031	2,5%	
Для негативного контролю					
На момент випуску					
1 / 0113	0,038; 0,036; 0,033; 0,035	0,036	0,002	5,9%	7,1%
2 / 0213	0,036; 0,031; 0,038; 0,032	0,034	0,003	9,6%	
3 / 0313	0,045; 0,040; 0,041; 0,040	0,042	0,002	5,7%	
На момент закінчення терміну придатності					
1 / 0113	0,036; 0,037; 0,031; 0,032	0,034	0,003	8,7%	7,3%
2 / 0213	0,037; 0,035; 0,034; 0,033	0,035	0,002	4,9%	
3 / 0313	0,044; 0,049; 0,040; 0,046	0,045	0,004	8,4%	

### ВИСНОВКИ

1. На прикладі імуноферментного набору для якісного (напівкількісного) визначення специфічних IgA-антитіл до *Ch. trachomatis* проведено науково-методичне обґрунтування процедури валідації засобу для серологічної *in vitro* діагностики. Валідаційні характеристики визначали як на момент випуску діагностичного набору, так і на момент закінчення терміну придатності (для встановлення його стабільності).
2. Показники діагностичної чутливості та специфічності, встановлені за допомогою внутрішньовиробничої панелі сироваток (2 позитивних та 50 негативних зразків) склали 100 %.
3. Присутність у досліджуваних зразках антитіл класів IgG та IgM до збудника уrogenітального хламідіозу не впливала на коректність визначення специфічних IgA-антитіл.
4. Лінійність методики є задовільною як для якісного виду аналізу. Збіжність результатів аналізу знаходилася у межах від 3,4 % до 6,8 %, а внутрішньолaborаторна прецизійність – від 4,0 % до 7,3 %, залишаючись прийнятною (≤ 10 %) як на момент випуску, так і на момент закінчення терміну придатності.

5. Імуноферментний аналіз визнано валідованим із задовільними результатами, а діагностичний набір – стабільним упродовж 1 року.

#### Список літератури

1. Державна фармакопея України. Перше видання. Доповнення 2 // Під ред. О.І. Гризодуба. – Х.: РІРЕГ, 2008. – 617 с.
2. Галкін О.Ю. Параметри біоаналітичної стандартизації засобів для серологічної діагностики / О.Ю. Галкін // Матеріали IV Міжнародної науково-практичної конференції «Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології» (16-17 жовтня 2014 р., м. Харків). – Х., 2014. – С. 74–75.
3. РМГ 61–2010. Государственная система обеспечения единства измерений. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки [Текст]. – Взамен РМГ 61–2003; дата введения 2012–09–01. – М.: Стандартинформ, 2012. – 60 с.
4. Урбах В.Ю. Математическая статистика для биологов и медиков / В.Ю. Урбах. – М.: Издательство АН СССР, 1963. – 321, [1] с.
5. Гураль А.Л. К проблеме оценки диагностических характеристик тест-систем для выявления антител к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ) / А.Л. Гураль, Т.А. Сергеева, Е.Н. Кислых // Лабораторная диагностика. – 1999. – №1. – С. 50–54.
6. Galkin O.Yu. Approaches to the synthesis of conjugates for enzyme immunoassay test-systems and evaluation of their use for diagnostics of infectious diseases / O.Yu. Galkin // Український журнал клінічної та лабораторної медицини. – 2010. – 5, № 4 – С. 54–60.
7. Parreno V. Validation of an indirect ELISA to detect antibodies against BoHV-1 in bovine and guinea-pig serum samples using ISO/IEC 17025 standards / V. Parreno, S.A. Romera, L. Makek et al. // J. Virol. Meth. – 2010. – Vol. 169, 1. – P. 143–153.
8. Ederveen J.C. A practical approach to biological assay validation / J.C. Ederveen. – Hoofddorp: Progress, 106 [1] p.
9. Schultheiss O.C. Assessment of salivary hormones / O.C. Schultheiss, S.J. Stanton // Methods in Social Neuroscience / Editors E. Harmon-Jones, and J.S. Beer. – New York: Guilford Press, 2009. – P. 17–44.

**Галкин А.Ю. Биоаналитическая валидация иммуноферментного анализа для качественного (полуколичественного) определение антител класса IgA к *Chlamydia trachomatis* / А.Ю. Галкин, Ю.В. Горшунов, А.Б. Бесараб // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2014. – Т. 27 (66), № 3. – С.14-25.**

Целью данного исследования являлось научно-методическое обоснование процедуры валидации средства для серологической *in vitro* диагностики на примере иммуноферментного набора для качественного (полуколичественного) определение специфических антител класса IgA к *Chlamydia trachomatis*. Валидационные характеристики (прецизионность, диагностическая и аналитическая специфичность, диагностическая чувствительность, относительная линейность) определяли как на момент выпуска диагностического набора, так и на момент окончания срока годности (как элемент исследования стабильности). Показатели диагностической чувствительности и специфичности установленные при помощи внутрипроизводственной панели сывороток (20 положительных и 50 отрицательных) составили 100 %. Присутствие в исследуемых образцах антител других классов к возбудителю урогенитального хламидиоза не влияло на корректность анализа по определению специфических антител класса IgA. Линейность методики была удовлетворительной. Сходимость результатов анализа находилась в пределах от 3,4% до 6,8%, а внутрилабораторная прецизионность – от 4,0 % до 7,3 %, оставаясь приемлемой ( $\leq 10\%$ ) как на момент выпуска, так и на момент истечения срока годности. Метод иммуноферментного анализа признано валидированным, а диагностический набор стабильным на протяжении 1 года.

**Ключевые слова:** иммуноферментный анализ, валидация, антитела, *Chlamydia trachomatis*.

**BIOANALYTICAL VALIDATION OF THE ENZYME IMMUNOASSAY FOR THE QUALITATIVE (SEMI-QUANTITATIVE) DETERMINATION OF IGA CLASS ANTIBODIES TO *CHLAMYDIA TRACHOMATIS***

*Galkin A.Yu.<sup>1</sup>, Gorshunov Yu.V.<sup>2</sup>, Besarab A.B.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*National Technical University of Ukraine "Kyiv Polytechnic Institute", Kyiv, Ukraine*

<sup>2</sup>*Research and Design-Technological Institute of Urban Development, Kyiv, Ukraine*

*E-mail: alexfbt@mail.ru*

Evaluation of the suitability of analytical methods is one of the most important elements of the quality management system in pharmaceutical and biotech industries. Validation of analytical methods is a procedure of experimental proof that the method is suitable for solving the tasks. It should be noted that the medical device for serological *in vitro* diagnostic have several features and differences from pharmaceutical preparations, through their bioanalytical approaches to standardization are different from similar approaches used in the case of drugs. Previously we have analyzed the requirements of national and international regulations concerning the quality and safety of medical devices for *in vitro* diagnostics and discussed the possibility of a partial application of the recommendations of the State Pharmacopoeia of Ukraine for this type of products. We have determined that the parameters bioanalytical standardization and validation characteristics for qualitative (semi-quantitative) tools for serological diagnosis can be precision (convergence, intra laboratory precision and reproducibility), diagnostic and analytical specificity, diagnostic sensitivity, and for quantitative – in addition correctness (accuracy) linearity, analytical sensitivity and range of application. Given the lack of national guidelines for bioanalytical methods validation used in serological diagnosis, we consider it extremely important to the creation of scientific and methodological recommendations for the validation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test-kits for qualitative and quantitative determination of different bioanalytes.

The aim of this study was scientific and methodical substantiation of validation procedures for medical device for serological *in vitro* diagnostic, for example, the enzyme immunoassay test-kit for the qualitative (semi-quantitative) determination of specific IgA antibodies to *Chlamydia trachomatis*. This work is a part of research “Scientific-methodical study of analytical parameters of quality and standardization of production facilities for serological diagnosis of infectious and non-infectious diseases”, which performed at the Department of Industrial Biotechnology of NTUU “KPI”.

The validation characteristics (precision, diagnostic and analytical specificity, diagnostic sensitivity, relative linearity) was measured both at the time of manufacture of a diagnostic kit as well as at the expiration date (stability study). Diagnostic sensitivity (DSe) and specificity (DSp) were determined by means of intraindustrial sera panel (20 positive and 50 negative samples) because the sera panel for assessing the quality of diagnostic ELISA kits for diagnosis of urogenital chlamydiosis is not common (20 positive and 50 negative samples). The key point in determination of DSe and DSp for the qualitative (semi-quantitative) ELISA is to establish cut-off level. There are various methodological approaches to calculate cut-off level, but we are use the most universal

approach (average optical density of negative samples plus triple standard deviation). Using this approach DSe and DSp indicators were 100%. The presence of antibodies of other classes (IgG, and IgM) to *Ch. trachomatis* not affect the validity of the analysis to identify specific antibodies of class IgA. The linearity of the methods was satisfactory. Precision can be seen at various levels, including: repeatability (intra assay variation) describes variations in performances analysis under the same conditions in a short period of time; inter-mediate precision (inter assay variation) describes the impact inter laboratory variations; reproducibility characterizes the degree of closeness results in inter-laboratory experiment. In our work we assessed: the convergence of the study sera positive and negative controls in one setting in 4 repetitions at 4 ELISA plates; inter-mediate precision in the study of positive and negative serum controls within 3 performances on different days by different operators in different kit series. Repeatability of analysis ranged from 3.4% to 6.8%, and intermediate precision – from 4.0% to 7.3%, while remaining acceptable ( $\leq 10\%$ ) as at the time of manufacture and at the expiration date. Enzyme immunoassay has been recognized as validated and diagnostic kit stable for 1 year.

**Keywords:** enzyme immunoassay, validation, antibodies, *Chlamydia trachomatis*.

#### References

1. State Pharmacopoeia of Ukraine, First Edition, Appendix 2, Ed. A.I. Hryzodub (RIREG, Kharkiv, 2008).
2. Galkin O.Yu., Options bioanalytical tools for standardizing the serological diagnosis, *Abstract of the IV International scientific and practical conference "Recent advances in pharmaceutical technology and biotechnology"* (Kharkiv, 2014), p. 74–75.
3. RIS 61–2010, State system for ensuring the uniformity of measurements. Indicators of precision, accuracy, precision methods of quantitative chemical analysis. Assessment methods (Standartinform, Moscow, 2012).
4. Urbach V.Yu., *Mathematical statistics for biologists and medical* (Publishing House of the USSR Academy of Sciences, Moscow, 1963).
5. Gural A.L., Sergeeva T.A, and Kislyh E.N., To the problem of the evaluation of diagnostic performance test-systems for the detection of antibodies to human immunodeficiency virus (HIV), *Laboratory diagnosis*, **1**, 50 (1999).
6. Galkin O.Yu., Approaches to the synthesis of conjugates for enzyme immunoassay test-systems and evaluation of their use for diagnostics of infectious diseases, *Ukrainian J. Clin. Labor. Med.*, **5 (4)**, 54 (2010).
7. Parreno V., Romera S.A., Makek L., Rodriguez D., Malacari D., Maidana S., Compaired D., Combessies G., Vena M.M., Garaicoechea L., Wigdorovitz A., Marangunich L., Fernandez F., Validation of an indirect ELISA to detect antibodies against BoHV-1 in bovine and guinea-pig serum samples using ISO/IEC 17025 standards, *J. Virol. Meth.*, **169 (1)**, 143, 2010.
8. Ederveen J.C., *A practical approach to biological assay validation* (Progress, Hoofddorp, 2010).
9. Schultheiss O.C. and Stanton S.J., Assessment of salivary hormones / *Methods in Social Neuroscience*. Editors E. Harmon-Jones and J.S. Beer (Guilford Press, New York, 2009).

Поступила в редакцію 26.10.2014 з.

**УДК 577.112.4**

**КРАТКОСРОЧНОЕ ВЛИЯНИЕ ДЕНАТУРИРУЮЩИХ ГИДРОФОБНЫХ  
АГЕНТОВ НА ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКУЮ ПОДВИЖНОСТЬ  
ГЕМОГЛОБИНА КРОВИ ЧЕЛОВЕКА**

*Гидулянов А.А.*

*Крымский агротехнологический университет, Симферополь, Республика Крым, Россия  
E-mail: sgaa@mail.ru*

Изучено влияние хлороформа и бензола на электрофоретическую подвижность фракций гемоглобина. Получены данные, свидетельствующие об изменении электрофоретической подвижности гемоглобина под влиянием исследуемых углеводов.

**Ключевые слова:** гемоглобин, хлороформ, бензол, электрофоретическая подвижность.

**ВВЕДЕНИЕ**

Воздействие комплекса химических веществ в концентрациях, наиболее часто встречающихся в реальных условиях, в большинстве случаев вызывает неспецифические реакции организма разной степени выраженности, которые зависят от морфофункционального состояния тканевых и клеточных структур. В последние годы все большее значение приобретают исследования комплексного влияния органических соединений как в эксперименте, так и в клинике [1, 2].

К одним из наиболее распространенных загрязнителей окружающей среды можно отнести бензол и хлороформ, широко распространенные в окружающей среде. Основными их источниками являются автотранспорт, предприятия газодобывающей, газо- и нефтеперерабатывающей промышленности, машиностроение. Вместе с тем, в современной литературе представлено крайне ограниченное число исследований, посвященных механизму действия указанных ксенобиотиков, реализующихся на молекулярном и клеточном уровнях и связанных с изменениями структурно-функциональных особенностей биологических молекул. Выяснение механизма взаимодействия гидрофобных низкомолекулярных веществ с белками требует проведения исследований на белковых моделях с использованием разных веществ гидрофобной природы [3, 4]. В связи с этим целью данной работы было проведение сравнительного анализа влияния хлороформа и бензола на электрофоретическую подвижность гемоглобина.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Материалом исследования в качестве модельного раствора гемоглобина служил гемолизат эритроцитов крови человека, полученный методом «осмотического

шока», в который добавляли дистиллированную воду до конечной концентрации гемоглобина 0,03 % [5]. Раствор белка насыщали бензолом и хлороформом в стеклянных бюксах объёмом 5 мл путем наслаивания 3 мл раствора белка на 1.5 мл лиганда с последующей инкубацией образцов при комнатной температуре в течение 5, 10, 20 и 30 минут. Электрофорез проводили в трубочках в 7% ПААГ при 250-340 В при силе тока 2-5 мА на каждую трубку. Продолжительность разделения составляла 2,5-3 часа [6].

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Хлороформ и бензол оказывают денатурирующее действие на биополимеры. В данном исследовании использовали насыщения гемоглобина, при которых медленно устанавливается равновесие в системе хлороформ (бензол) □ вода-белок и происходит связывание лигандов гидрофобными участками молекулы белка. Возникает естественный вопрос о том, какое влияние на структуру белка оказывает связывающиеся с ним хлороформ и бензол, вследствие чего представляется важной оценка влияния этих углеводородов на структуру молекулы гемоглобина и обратимость действия данных денатурирующих агентов.

Анализ результатов проведенных исследований электрофоретических свойств белка, насыщенного хлороформом и бензолом, показывает, что в случае связывания хлороформа с гемоглобином электрофоретическая подвижность первой фракции гемоглобина по сравнению с нативным гемоглобином в течение 5, 10, 20 и 30-минутного воздействия не претерпевает никаких изменений (табл. 1). Такая же динамика отмечается и для второй фракции гемоглобина.

Таблица 1

#### Изменение электрофоретической подвижности гемоглобина под влиянием хлороформа ( $M \pm m, R_f$ )

Время экспозиции (мин)	Фракции	Контрольные образцы	Взаимодействие с хлороформом
5	1	0,66±0,05	0,64±0,04
	2	0,58±0,04	0,57±0,06
	3	0,49±0,04	0,48±0,05
10	1	0,67±0,06	0,68±0,04
	2	0,58±0,05	0,6±0,04
	3	0,51±0,05	0,52±0,04
20	1	0,68±0,05	0,61±0,05
	2	0,56±0,04	0,51±0,03
	3	0,52±0,03	0,41±0,03*
30	1	0,65±0,05	0,65±0,03
	2	0,57±0,04	0,54±0,03
	3	0,5±0,06	0,39±0,01*

Примечание: \*- достоверность различий показателей по сравнению с контрольными образцами ( $p < 0,05$ ).

Содержание 3-ей фракции гемоглобина при взаимодействии ее с лигандом достоверно снижалось : при 20- и 30-минутной икубации с хлороформом – на 21,2 % и

22 % соответственно, в то время как кратковременное влияние лиганда (5- и 10-минутное воздействие) не вызывало выраженных изменений в ее содержании. Таким образом, 3-я фракция гемоглобина наиболее подвержена воздействию хлороформа.

Также было исследовано влияние бензола на электрофоретическую подвижность гемоглобина. Полученные данные, представленные в табл. 2, свидетельствуют о том, что в случае связывания гемоглобина с бензолом в условиях 5- и 10-минутного влияния лиганда электрофоретическая подвижность достоверно не изменялась. При более длительном воздействии бензола, в частности, при 20-минутной инкубации отмечалось снижение электрофоретической подвижности первой фракции гемоглобина на 22%, при 30-минутной  $\square$  на 23,1%. Для второй фракции гемоглобина была отмечена та же динамика: 20-минутное взаимодействие гемопротеида с бензолом снижало электрофоретическую подвижность на 17,9%, а взаимодействие с бензолом в течение 30 минут уменьшало исследуемый показатель на 21,0%.

Таблица 2

**Изменение электрофоретической подвижности гемоглобина  
под влиянием бензола ( $M \pm m, R_f$ )**

Время экспозиции (мин)	Фракции	Контрольные образцы	Взаимодействие с бензолом
5	1	0,66±0,05	0,66±0,05
	2	0,58±0,04	0,59±0,06
	3	0,49±0,04	0,47±0,02
10	1	0,67±0,06	0,66±0,07
	2	0,58±0,05	0,59±0,06
	3	0,51±0,05	0,5±0,04
20	1	0,68±0,05	0,53±0,04*
	2	0,56±0,04	0,46±0,02*
	3	0,52±0,03	0,45±0,03
30	1	0,65±0,05	0,5±0,04*
	2	0,57±0,04	0,45±0,03*
	3	0,5±0,06	0,39±0,02

*Примечание:* \* - достоверность различий показателей по сравнению с контрольными образцами ( $p < 0,05$ ).

При сравнении электрофоретической подвижности гемоглобина, инкубированного с бензолом и хлороформом, оба денатурирующих агента оказывают воздействие на гемопротеид, что воспроизводится во всех электрофоретических экспериментах, как при инкубации гемопротеида с хлороформом, так и при инкубации с бензолом.

Интересен тот факт, что при влиянии хлороформа выраженным изменениям подвергается лишь 3-я фракция гемоглобина, а под воздействием бензола изменения претерпевают 1-я и 2-я фракции.

Одним из возможных объяснений наблюдаемого изменения электрофоретической подвижности гемоглобина крови под действием хлороформа

и бензола может быть образование дисульфидных мостиков -S-S- за счет -SH-групп глобина молекулы гемоглобина. Можно предположить, что насыщение гемоглобина как хлороформом, так и бензолом оказывает денатурирующее воздействие на структуру изучаемого гемопротеида. Как следствие, реализуется возможность образования полимерных форм белка, усиливается агрегация белковых молекул, на что указывает более плотная окраска исследуемого раствора гемоглобина после инкубации его с углеводородами.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Показано, что насыщение гемоглобина крови человека низкомолекулярными углеводородами в модельном эксперименте приводит к уменьшению электрофоретической подвижности отдельных фракций исследованного гемопротеида.
2. Установлено, что при экспозиции гемоглобина с хлороформом и бензолом выявляется их сходный денатурирующий эффект, начинающийся после 20-минутного воздействия лигандов, что выражается в изменении электрофоретической подвижности фракций гемоглобина, инкубированных с изученными углеводородами.

#### Список литературы

1. Михайлова И.В. Влияние бихромата калия, бензола и смеси веществ на иммунный ответ мышей / И.В. Михайлова, А.И. Смолягин, Е.В. Ермолина и др. // Вестник ОГУ. - 2009. - №6. - С. 249-251.
2. Ермолина Е.В. Исследование длительного комбинированного влияния бензола и хрома на морфофункциональное состояние нейроэндокринной и иммунной систем крыс Вистар / Е.В. Ермолина, А.А. Стадников, И.В. Михайлова, А.И. Смолягин // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. - 2012. - Т. 14, №5(2). - С. 444-447.
3. Воронин В.М. Изучение канцерогенности хлороформа / В.М. Воронин, Н.Н. Литвинов, В.И. Казачков // Вопросы онкологии. - 1987. - Т.33, №8. - С.81-85.
4. Васьковская Л. Ф. Циркуляция и трансформация хлорфосфатов, ртутьпроизводных препаратов в системе окружающая среда биологический объект / Л. Ф. Васьковская - К.: Наукова думка, 1985. - С.156.
5. Drabkin D. A simplified technique for large scale crystallization of myoglobin and haemoglobin in the crystalline / D. Drabkin // Arch. Biochem. - 1949. - Vol.21 - P.224 - 226.
6. Гааль Э, Медыша Г, Верецкий А. Электрофорез в разделении биологических макромолекул / Э. Гааль, Г. Медыша, А.Верецкий. - М.: Мир, 1982. - 446 с.

**SHORT-TERM EFFECTS OF DENATURING HYDROPHOBIC AGENTS ON THE ELECTROPHORETIC MOBILITY OF HUMAN HEMOGLOBIN**

*Gidulyanov A.A.*

*Southern Branch NUL&ES of Ukraine "Crimean Agrotechnological University", Simferopol, Crimea, Russia  
E-mail: sgaa@mail.ru*

Influence of a complex of chemical substances in the concentration most often meeting in actual practice, in most cases causes nonspecific reactions of an organism of different degree of expressiveness which depend from morphofunctional conditions of fabric and cellular structures. Last years the increasing value is got by researches of complex influence of organic connections both in experiment, and in clinic.

It is possible to carry benzole and chloroform to one of the most widespread pollutants of environment. Benzole and chloroform widespread in environment as their basic sources are motor transport, the enterprises gas, gazo - and petroleum-refining industry, mechanical engineering. At the same time till now in the literature there is the extremely limited number of the researches devoted to the mechanism of action specified xenobiotics, realised on molecular both cellular levels and connected with changes of structure of biological molecules, and, hence, and with functions carried out by them. Finding-out of the mechanism of interaction of waterproof low-molecular substances with fibers demands carrying out of researches on albuminous models with use of different substances of the waterproof nature. In this connection carrying out of the comparative analysis of influence of chloroform and benzole on electrophoretic mobility of haemoglobin was the purpose of this research.

**Keywords:** hemoglobin, chloroform, benzole, electrophoretic mobility.

**References**

1. Mikhailova I.V. Effect of potassium dichromate, benzole and mixtures of substances on the immune response of mice / I.V.Mihaylova, A.I. Smolyagin, E.V. Ermolina et al. // Vestnik OGU. - 2009. - №6.- P. 249-251.
2. Ermolina E.V. Long study of the combined influence of benzole and chromium on the morphofunctional state of the neuroendocrine and immune systems in Wistar rats / E.V. Ermolina, A.A. Stadnikov, I.V. Mikhailov, A.I. Smolyagin // the Samara Scientific Center of the Russian Academy Science.- 2012.- T. 14, №5 (2) .- P. 444-447.
3. Voronin V.M., Litvinov N.N., Kazatchkov V.I. Study carcinogenicity of chloroform, *Problems of Oncology*, **33**, 81-85 (1987).
4. Vaskovskaya L.F. *Circulation and transformation chlorophosphate, rtutproizvodnyh drugs in the system environment to biological*, 156 p. (Naukova Dumka, 1985).
5. Drabkin D.A simplified technique for large scale crystallization of myoglobin and haemoglobin in the crystalline, *Arch. Biochem*, **21**, 224 – 226 (1949).
6. Gaal E., Medysha F., Veretsky A. *Electrophoresis separation of biological macromolecules*, 446 p. (Nauka, 1982).

*Поступила в редакцию 08.10.2014 г.*

**УДК 502.5:576.353**

## **ИССЛЕДОВАНИЕ СОВМЕСТНОГО ДЕЙСТВИЯ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ПЕСТИЦИДОВ И ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА ЧАСТОТУ МУТИРОВАНИЯ КЛЕТОК КОРНЕВОЙ МЕРИСТЕМЫ *ALLIUM SEPA* L.**

*Ибрагимова Э.Э.*

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

В статье приведены результаты исследования совместного действия остаточных количеств пестицидов и тяжелых металлов на частоту мутирования клеток корневой меристемы *Allium cepa* L. Установлено, что тяжелые металлы в высоких концентрациях совместно с остаточными количествами пестицидов вызывают выраженное негативное цитогенетическое действие на тест-систему *Allium cepa*. Тестируемые поллютанты проявляют большую способность вызывать нарушения митоза, связанные с повреждением митотического аппарата, чем нарушения, связанные с повреждением и нарушением структуры хромосом.

**Ключевые слова:** тяжелые металлы, остаточные количества пестицидов, хромосомные нарушения, *Allium cepa* L.

### **ВВЕДЕНИЕ**

Использование пестицидов в сельском хозяйстве имеет регулярный характер, в силу чего приобретает все более широкие масштабы. Систематическое использование этих веществ может привести к загрязнению и последующей деградации почв сельскохозяйственных угодий [1]. В связи с этим сельскохозяйственное производство стало одним из основных загрязнителей окружающей среды [2]. Беспокойство общественности вызывает возможность загрязнения почв [3], воды [4], растений [5, 6], в том числе урожая и продуктов его переработки [7, 8] остаточными количествами пестицидов, поскольку установлено, что только некоторая часть пестицидов поглощается растительностью, большая же часть из загрязненной почвы выносится с поверхностным и грунтовым стоком, загрязняя водоисточники [9]. Проблема применения пестицидов также обостряется в результате того, что основной ассортимент пестицидов, представленных на рынке, относится к веществам импортного производства [10], на которые отсутствуют паспортные данные об экологической и генетической опасности. По данным Пилинской М.А. [11], из 407 проверенных на мутагенность пестицидов, генетическая активность зафиксирована у 263 соединений, независимо от числа используемых тест-систем и частоты совпадений положительных результатов. Несмотря на это, отказаться от использования пестицидов невозможно, так как, их исключение из сельскохозяйственной практики приведет к уменьшению урожая в 2

раза и возрастанию цены на продукцию на 100–300% [12]. В связи с этим, сельское хозяйство должно рассматриваться в тесной связи с качеством окружающей среды [13] для чего необходимо проводить изучение токсического действия пестицидов на биоту. Для определения механизмов токсического действия пестицидов на организм того или иного вида, важно исследовать влияние этих соединений на функционирование ядерного аппарата клетки и частоту мутирования в нем. В частности, установлено отрицательное генетическое действие на семена сельскохозяйственных культур дильдрин, ДДТ [14], 2,4-Д [15], хлорсульфурона [16], атразина и глифосата [17], прометрина [18], раундепа [19], титуса [20] и других препаратов [21-23], о чем свидетельствует достоверное увеличение частоты разных типов хромосомных aberrаций и достоверное снижение митотического индекса.

В литературе имеются сведения, что пестициды, как мутагены сами по себе, могут вступать в соединение с другими мутагенами, образуя сложные, более токсичные комплексы, создающие дополнительный мутагенный фон [24]. В связи с этим изучалось цитогенетическое действие солей марганца и цинка с гербицидом 2М–4ХП [25]. Известно, что 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота и ее натриевая соль проявляют незначительную мутагенную активность [26]. Однако при совместном действии выше названных веществ мутагенный эффект в корешках *Vicia faba* значительно превышал мутагенный эффект действия этих веществ в отдельности. Следовательно, большое количество используемых в сельскохозяйственном производстве препаратов оказывают цитогенетическое действие на культурные растения. Однако вопрос совместного действия различных поллютантов антропогенного происхождения остается малоизученным. В связи с этим целью наших исследований явилось изучение комплексного воздействия тяжелых металлов и остаточных количеств пестицидов, содержащихся в почвах агроценозов, расположенных вдоль автострад, на частоту мутирования клеток корневой меристемы лука.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нами был проведен анализ загрязнения сельскохозяйственных почв Крыма остаточными количествами пестицидов (байлетон, БИ-58, инсегар) и тяжелыми металлами (медь, цинк, свинец). Для исследования были выбраны следующие территории, расположенные вдоль автотрасс с различной интенсивностью движения: I – Бахчисарайский район (с. Брянское) – низкая интенсивность движения, II – пригородная зона г. Алушты – средняя загруженность, III – Симферопольский район (с. Кольчугино) – высокая интенсивность движения автотранспорта. Методы определения тяжелых металлов (ГМ) и остаточных количеств пестицидов (ОКП), а также их содержание описаны в предыдущей публикации [27]. Контролем служили почвенные образцы с территорий, находящихся на значительном расстоянии от техногенных источников, в качестве фоновых (Ф) использовались образцы почв придорожной зоны автотрасс с интенсивным движением автотранспорта. В исследованных почвенных образцах сельскохозяйственных угодий обнаружены ОКП (байлетон, БИ-58, инсегар) в

количествах ниже ПДК, ТМ (свинец и медь) – выше ПДК. Содержание ТМ в почвах: Симферопольский район > Алушта > Бахчисарайский район > Фон. В фоновых образцах концентрация ТМ – в пределах ПДК.

Для скрининга цитогенетической активности совместного действия ТМ и ОКП использовали модифицированный Allium-тест, дающий возможность изучить цитогенетичность, документированную микроскопическим исследованием хромосомных aberrаций и ядерных аномалий в клетках корневой меристемы [28, 29]. Генотоксические эффекты указанных экотоксикантов выявляли путем анализа частоты встречаемости разных типов цитогенетических аномалий, для чего в каждом варианте исследования были рассмотрены следующие параметры: количество клеток с хромосомными мостами, фрагментами и слипанием хромосом, отставанием хромосом, мультиполярными митозами, количество двуядерных клеток, неравномерная окрашиваемость (сегментированность) хромосом по длине, метафазные пластинки с диспергированными, а также укороченными и утолщенными хромосомами (К-митоз) [28]. Указанные аномалии были суммированы в общий количественный показатель – индекс митотических aberrаций (ИА), указывающий на соотношение между суммарным количеством aberrаций определенного типа в различных вариантах и суммарным количеством этих aberrаций в контроле. Все наблюдаемые аномалии были ранжированы по следующей классификации [30, 31]:

1. патологии, связанные с повреждением хромосом (кластогенный эффект), а также с нарушением их структуры;
2. патологии, связанные с повреждением митотического аппарата;
3. патологии, являющиеся следствием нарушения прохождения цитокинеза.

К первой группе аномалий, наблюдаемых в митотических клетках, относятся патологии, связанные с нарушением или повреждением структуры хромосом. Аномалии 2-й и 3-й – анеугенные эффекты (цитогенетические повреждения на надхромосомном уровне).

Для определения мутагенного эффекта экотоксикантов применяли ана-телофазный метод учета перестроек хромосом в клетках корневых меристем лука [29, 32]. Методика фиксации, хранения, мацерации материала, окрашивание и приготовление временных препаратов описаны в предыдущей публикации [33]. Исследования проводили в четырехкратной повторности. Статистическую обработку полученных экспериментальных данных осуществляли с использованием пакета прикладных программ “Microsoft Excel 2000”. Достоверность различий данных определяли с помощью t-критерия Стьюдента [34].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На микропрепаратах кончиков корней лука, пророщенных на субстратах с различным содержанием поллютантов, были зарегистрированы многочисленные нарушения в митотических и интерфазных клетках. Основными хромосомными дефектами клеток корневой меристемы были: сегментированная окраска хромосом, фрагментация, ана-телофазные мосты, слипание (табл. 1).

**Таблица 1**  
**Показатели хромосомных дефектов в делящихся клетках *Allium cepa* L.**  
**в различных вариантах исследования**

	Вариант	Хромосомные дефекты, %				ИАк
		сегментиро- ванная окраска	Кластогенные эффекты			
			фрагментация	мосты	слипание	
.	К	0,2±0,03	0,2±0,03	0,3±0,06	–	–
.	Ф	0,9±0,09**	1,3±0,03**	1,2±0,1**	0,5±0,03	5,1±0,74
.	І	1,0±0,09**	2,1±0,1**	2,3±0,1***	0,9±0,1	9,8±1,08
.	ІІ	1,8±0,06***	2,1±0,07**	0,8±0,06**	1,4±0,09	12,1±2,08
.	ІІІ	2,0±0,07***	2,4±0,07**	0,7±0,05*	2,7±0,07	12,3±2,00

*Примечание.* Отличия от контроля достоверны при \* –  $p \leq 0,1$ ; \*\* –  $p \leq 0,05$ ; \*\*\* –  $p \leq 0,001$

При учете мутагенного действия тестируемых почв, загрязненных ТМ и ОКП, были отмечены образования фрагментов хромосом и хромосомных мостов. Также была обнаружена такая аномалия как неравномерное или полное неокрашивание хромосом. По-видимому, данное повреждение является следствием нарушения структуры белковых соединений, входящих в состав хромосом. Наше предположение основано на том, что ядерные красители, используемые при цитогенетическом анализе, окрашивают белки, входящие в состав хромосом и отсутствие или сегментированность их окраски может свидетельствовать о нарушении структуры белковых молекул хромосом. Согласно литературным данным [35], неполное окрашивание является дефектом функции структурных белков хромосом, а также нарушением функционирования ферментов, ответственных за формирование метафазной пластинки. Данная аномалия имела дозозависимый характер: количество клеток с неравномерным окрашиванием увеличивалось по мере возрастания загрязняющих компонентов в почвах. Количество клеток с указанным типом повреждения увеличивалось в фоновом и І варианте исследования в 4,5-5 раз ( $p < 0,01$ ) по сравнению с контролем, во ІІ варианте – в 9 раз ( $p < 0,001$ ), в ІІІ – в 10 раз ( $p < 0,001$ ) соответственно. Аналогичная картина наблюдалась с фрагментированными хромосомами. Так, в фоновом варианте регистрировалось увеличение клеток с данным повреждением в 6,5 раза ( $p < 0,001$ ), в І и ІІ вариантах исследования – в 10,5 раза ( $p < 0,001$ ), в ІІІ – в 12 раз ( $p < 0,001$ ) по сравнению с контролем. Следует отметить, что не все виды повреждений ядерного аппарата имели дозозависимый характер. Количество клеток с хромосомными мостами было наибольшим в І варианте и увеличивалось в 7,7 раза ( $p < 0,001$ ) по сравнению с контролем, тогда как в ІІІ варианте их количество превышало наблюдаемое в контроле в 2,5 раза ( $p < 0,01$ ).

Во II и III вариантах исследования на препаратах регистрировалось увеличение меристематических клеток со слипшимися хромосомами. Fiskesj G. [36] указывает, что данная хромосомная aberrация является результатом действия высокотоксичных веществ и представляет собой нерепарируемый эффект, приводящий в конечном счете к элиминации клетки. Установлено [30], что эту митотическую аномалию индуцируют ТМ в летальных концентрациях. Следовательно, суммарное количество тестируемых соединений в исследуемых почвах достигало летальных концентраций, что проявлялось в увеличении числа клеток со слипшимися хромосомами. О смерти клеток также свидетельствует пикноз ядерного аппарата, наблюдаемый в интерфазных клетках II и III вариантов исследования. Довгалюк А.И. с соавторами [30] установили, что пикноз ядерного аппарата свидетельствует о некрозе ткани.

При микроскопическом исследовании были выявлены единичные клетки с сильно выраженным плазмолизом, также в зоне дифференциации многие клетки корешков лука имели плотную конденсированную цитоплазму. Полещук Н.А. [37] отмечает, что такая морфологическая картина типична для процесса программируемой клеточной гибели у растений при действии ксенобиотиков. При анализе корешков лука, выращенных на контрольных и фоновых субстратах, подобных аномалий выявлено не было, что является аргументом в пользу того, что подобная аномалия может быть последствием неблагоприятного действия пестицидов, причем в сублетальных, «малых» концентрациях.

Сравнительный анализ индексов aberrаций кластогенного типа (ИА<sub>к</sub>) позволил построить ряд генотоксичности тестируемых почвенных образцов. Самым выраженным кластогенным эффектом обладали токсиканты почвы II и III зон. Полученные данные согласуются с положением о том, что токсический и кластогенный эффект соединений тяжелых металлов увеличивается по мере возрастания их концентраций [30, 31]. По способности индуцировать кластогенный эффект, тестируемые объекты расположились в следующей последовательности: Симферопольский район ≥ г. Алушта > Бахчисарайский район > Фон.

Анеугенная активность – способность нарушать прохождение митоза и цитокинеза – оказалась характерной для изученных экотоксикантов (табл. 2).

Таблица 2

Показатели анеугенного эффекта в клетках корневой меристемы *Allium cepa* L.

№	Вариант	Патологии митоза, связанные с повреждением митотического аппарата				
		отставание хромосом	мультиполярные митозы	К-митозы	двухядерные клетки	ИАа
1.	К	0,1±0,03	0,06±0,003	0,2±0,009	0,1±0,003	–
2.	Ф	1,1±0,06***	0,6±0,03***	0,8±0,06**	0,9±0,1**	4,8±0,64
3.	I	0,8±0,1**	0,6±0,09**	0,8±0,03***	1,4±0,07***	6,4±1,28
4.	II	0,9±0,07**	1,8±0,07***	1,7±0,06***	1,7±0,1***	13,3±2,07
5.	III	0,6±0,03	1,9±0,03***	3,1±0,1***	3,6±0,1***	15,7±1,53

Примечание. Отличия от контроля достоверны при \* – p ≤ 0,1; \*\* – p ≤ 0,05; \*\*\* – p ≤ 0,001

Основными патологиями митоза, связанными с повреждением митотического аппарата, в проведенном исследовании оказались: многополосный и колхициновый (К-) митоз, которые мы наблюдали при комплексном воздействии всех тестируемых соединений. Частота колхициновых митозов отличалась от контрольного и фонового и увеличивалась во II и III ( $p < 0,001$ ) вариантах исследования. Также основными нарушениями меристематических клеток были следующие: сегментированная окраска и фрагментация хромосом, диспергированность хромосом по метафазной пластинке, а также укорочение и утолщение хромосом.

Повреждения третьей группы, связанные с запаздыванием цитокинеза, приводили к образованию двуядерных клеток, что являлось результатом нарушения процесса образования внутри родительской клетки клеточной перегородки – фрагмопласта [38]. Сравнительный анализ тестируемых почвенных образцов позволил выявить дозозависимый характер данной аномалии. Причем следует отметить, что указанный тип нарушения митоза индуцируется и пестицидами [37] и солями тяжелых металлов [31]. При их совместном действии наблюдалось увеличение количества клеток с данной аномалией (Фон (ТМ) – Бахчисарайский район (ТМ+ОКП)). Как видно из представленных данных наиболее выраженным цитокинезблокирующим эффектом обладали почвы пригородной зоны г. Алушты и Симферопольского района.

Антимитотическое действие исследуемых токсикантов имело дозозависимый характер. При инициальных концентрациях ( $EC_{10}$ ) тестируемых соединений в изученных почвах имели место следующие виды повреждений: сегментированная окраска и отставание хромосом. При среднеэффективных концентрациях ( $EC_{10-50}$ ) наиболее ярко были выражены такие повреждения как фрагментация и слипание хромосом, хромосомные мосты, К-митозы, двуядерные клетки.

При довольно низком спонтанном уровне мутирования (контроль) во всех вариантах исследования регистрировалось увеличение процента аберрантных клеток по мере увеличения токсических веществ в исследованных почвенных образцах. Так повреждения, связанные с нарушением функционирования митотического аппарата, в частности, отставание хромосом, мультиполярные и К-митозы, практически оставались на одном уровне в фоновых почвах и образцах Бахчисарайского района. Аналогичная картина наблюдалась и с хромосомными дефектами, в частности, со слипанием хромосом. Хромосомные мосты явились аномалией наиболее ярко выраженной в Бахчисарайском районе, в то время как в зонах с большей концентрацией загрязняющих веществ, наблюдалось снижение данной хромосомной аберрации. По-видимому, пониженные концентрации изученных загрязнителей индуцировали данное повреждение. С повышением токсических веществ в почвах резко возрастало количество клеток с сегментированной окраской хромосом, их фрагментацией и слипанием, с мультиполярными и К-митозами. Увеличение продукции двуядерных клеток явилось аномалией, характерной для всех вариантов исследования, о чем свидетельствует рост количества двуядерных клеток по мере увеличения токсических веществ в изученных почвах. Отставание хромосом в нашем исследовании оказалось наименее редкой по частоте встречаемости аномалией –

процентное увеличение клеток с данным повреждением несколько возросло, а в III варианте снижалось до уровня контроля.

Анализ контрольного и опытных вариантов исследования показал, что в контрольном варианте частота встречаемости изученных аномалий (хромосомных дефектов и патологий митоза) отмечалась практически на одном уровне – 0,1 – 0,3%. В фоновом варианте увеличивалась продукция аберрантных клеток с фрагментацией и отставанием хромосом, двуядерностью. Для загрязнителей почв I варианта была наиболее выражена индукция таких повреждений как хромосомные мосты, фрагментация хромосом, а также резкое увеличение продукции двуядерных клеток, характерных для фона. При экологической оценке степени загрязнения было установлено, что количество ТМ в почвах Бахчисарайского района приближено к фоновым показателям. Однако наряду с ТМ исследованные почвы содержали и ОКП. По-видимому, данные химические загрязнители оказывают неблагоприятное совместное влияние на клетки корневой меристемы, что проявляется в увеличении спектра повреждений делящихся клеток и частоты мутирования в них.

Почвы II варианта характеризовались повышенной продукцией клеток с сегментированными хромосом, мультиполярными митозами и двуядерностью. В III варианте исследования наиболее выраженными были такие повреждения как сегментированная окраска, фрагментация и слипание хромосом, К-митозы, двуядерность. Следовательно, при фоновом и близком к нему содержанию поллютантов в почвах наиболее были выражены хромосомные дефекты ( $ИА_k > ИА_a$ ). При увеличении концентрации ТМ и ОКП в исследованных почвах (II и III варианты) отмечалось увеличение повреждений митотического аппарата ( $ИА_k < ИА_a$ ).

Проведенные опыты по изучению влияния комплексов остаточных количеств пестицидов и тяжелых металлов на процессы деления клеток корневой меристемы *Allium cepa* L., позволили прийти к заключению, что эффект воздействия данных поллютантов зависит от их концентрации.

Антимитотическое действие исследуемых поллютантов (ТМ и ОКП) имело дозозависимый характер – при увеличении концентраций загрязняющих веществ в почвах частота аномалий меристематических клеток повышалась. Довгалюк с соавторами [44] установили, что высокие (как правило, сублетальные) концентрации тяжелых металлов индуцируют в меристематических клетках *Allium cepa* К-митозы и многополюсные митозы. Сравнительный анализ индексов аберраций кластогенного типа ( $ИА_a$ ) позволил построить ряд генотоксичности тестируемых почвенных образцов: Симферопольский район > г. Алушта > Бахчисарайский район > Фон.

Сравнительный анализ индексов аберраций кластогенного типа ( $ИА_k$ ) и индексов аберраций анеугенного типа ( $ИА_a$ ) по всем вариантам исследования позволил прийти к заключению, что тестируемые поллютанты проявляют большую способность вызывать нарушения митоза, связанные с повреждением митотического аппарата, чем нарушения, связанные с повреждением и нарушением структуры хромосом ( $ИА_k < ИА_a$ ). При фоновых и близких к ним концентрациях токсических веществ (I вариант) наиболее ярко были выражены повреждения кластогенного типа.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования свидетельствуют, что содержащиеся в почвах агроценозов тяжелые металлы и остаточные количества пестицидов, оказывают совместное негативное цитогенетическое влияние, проявляющееся в увеличении частоты мутирования клеток корневой меристемы лука.

Фоновые почвы, загрязненные тяжелыми металлами, обладали практически одинаковым кластогенным (5,1) и анеугенным эффектом (4,8). Сельскохозяйственные почвы, загрязненные тяжелыми металлами и остаточными количествами пестицидов обладали более выраженным анеугенным эффектом на клетки корневой меристемы лука, что свидетельствует о совместном мутагенном действии тяжелых металлов и остаточных количеств пестицидов.

Тяжелые металлы и остаточные количества пестицидов, содержащиеся в почвах Симферопольского района и г. Алушты, индуцировали повышенную продукцию клеток с пикнотическими ядрами, К-митозами, слившимися хромосомами, двуядерностью, что свидетельствует о нарушении цитокинеза.

## Список литературы

1. Inomata O.N.K. Avaliação dos teores de endossulfan em diferentes profundidades do solo / Inomata O.N.K., Lemes Vera R.R., Baretto H.H.C. // Rev. Inst. A. Lutz. – 1996. – Vol. 56. – № 2. – P. 53-56.
2. Kookana R.S. Pesticide fate in farming systems: Research and monitoring: Abstr. International Symposium in Soil and Plant Analysis „Opportunities for the 21st Century: Expanding the Horizons for Soil, Plant and Water Analysis”, Brisbane, March 22-26, 1999 / Kookana R.S., Simpson B.W. // Commun. Soil Sci. and Plant Anal. – 2000. – Vol. 31, № 11–14. – P. 1641-1659.
3. Мельников Н.Н. Сравнительная опасность загрязнения почвы гербицидами / Н.Н. Мельников, С.П. Белан // Агротехника. – 1997. – № 2. – С. 66-67.
4. Vencill W.K. Herbicide surface runoff and leaching from a cotton-rye cropping system under contrasting tillage and nutrient management levels / Vencill W.K., Radcliffe D.E., Cabrera M.L., Endale D., Steiner J.L., Schomberg H.H. // Brighton Conf. “Weeds”: Proc. Int. Conf., Brighton, 15-18 Nov., 1999. – Vol. 2. – Farnham, 1999. – P. 663-668.
5. Ortega M. Respuesta de *Pinus halepensis* Mill y *Pinus pinaster* Ait. a herbicidas en condiciones de vivero / Ortega M., Villarroya M., Montero G. // Invest. agr. Sist.y recurs. forest. – 2000. – Vol. 9, № 1. – P. 137-145.
6. Wojdyla A.T. Efficacy of fungicides in the control of *Sphaerotheca pannosa* var. *rosal* on greenhouse rose cultivars and their influence on the growth of plants / Wojdyla A.T. // J. Plant Prot. Res. – 2000. – Vol. 40, № 1. – P. 60-67.
7. Mattina M.J.I. Chlordane uptake and its translocation in food crops / Mattina M.J.I., Iannucci-Berger W., Dykas L. // J. Agr. and Food Chem. – 2000. – Vol. 48, № 5. – P. 1909-1915.
8. Sawicka B. Ciemnienie miąższu bulw surowych ziemniaka w warunkach stosowania herbicydu Sencor 70 WP / Sawicka B., Dialo A.S. // Biul. Inst. hod.: aklim. rosl. – 1997. – № 203. – P. 187-197.
9. El-Kabbany S. Monitoring of the pesticide levels in some water supplies and agricultural lands, in El-Haram, Gisa (A.R.E.) / El-Kabbany S., Rashed M.M., Zayed M.A. // J. Hazardous Mater. – 2000. – Vol. 72, № 1. – P. 11-21.
10. Пестициды на вибір // Захист рослин. – 2001. – № 2. – С. 1-2
11. Пилинская М.А. Мутагенное действие пестицидов / М.А. Пилинская // Итоги науки и техники. – Серия общая генетика. – Т. 9: Химич. мутагенез. – 1986. – С. 97–151
12. Лісовий М.П. Інтегровані методи захисту рослин і можливості альтернативного (біологічного) землеробства в Україні / Лісовий М.П. // Вісн. аграр. науки. – 1997. – № 9. – С. 37-40, 97, 99.
13. Kamegama H. Влияние инструментов экологической политики на разработку сельскохозяйственной технологии, щадящей окружающую среду. Теория и практика /

- Kamegama H. // Kagawa daigaku nogakubu gakujuitsu hokoku = Techn. Bull. Fac. Agr. Kagawa Univ. – 1998. – Vol. 50. – № 1. – P. 17-32.
14. Шапкин В.А. Влияние хлорсульфурина на содержание фосфорных соединений в корнях проростков хлопчатника / В.А. Шапкин, А.К. Демурина, Л.И. Крюкова // Узб. биол. журн. – 1992. – № 4. – С.21-24.
  15. Chung R.A. Synthesis and aminoacyl transfer RNA activity of L-2071 cells exposed to dieldrin and DDT / Chung R.A., Williams C.S. // Arch. Environ. Contam. Toxicol. – 1986. – Vol. 15. – P. 581-588.
  16. Kriton K. Influence of herbicides hexazone and chlorsulfuron on the metabolism of isolated soybean leaf cells. / Kriton K., Hatrios L., Howe M. // Pestic. biochem and Physiol. – 1988. – № 3. – P. 17-22.
  17. Енцова Т.А. Цитологическое изучение действия гербицидов в системе *in vitro* у гороха / Т.А. Енцова, Н.С. Ляпкина, Н.Т. Нюн Ван, Т.В. Петрова // Генетика. – 1992. – Т.29. – № 8. – С. 26-28.
  18. Восканян Ф.З. Цитогенетический эффект арометрина на хромосомный аппарат *Crepis capillaries* / Ф.З. Восканян, В.А. Авакян // Биол. ж. Армении. – 1984. – Т. 37. – № 2. – С. 93-97.
  19. Попов П. Влияние на пестициды Раундпеп върху интензивността на клетъчната репродукция и хода на митозата при клетки от *C. capillaries*, Третирани в G<sub>1</sub>-период / Попов П., Попов Н. // Науч. тр. Биол. / Пловдив. унив. – 1987. – Т. 25, № 6. – С. 287-294.
  20. Григоренко Н.В. Цитогенетическое действие гербицида титуса на кукурузе / Н.В. Григоренко, Е.А. Ларченко // 4-й Съезд О-ва физиологов раст. России. Междунар. конф. «Физиол. раст.» – 2. – М., 1999. – С. 557-558.
  21. Butani J.V. Cytological effects of pesticides on onion (*Allium cepa* L.) root tip / Butani J.V., Shukla P.T. // Gujarat. Agr. Univ. Res. J. – 1994. – Vol. 20, № 1. – P. 60-65.
  22. Arif M. Toxicity of fungicides Nimrod and Dithane M-45 on mitotic cells of *Allium cepa* L. / Arif M., Vahidy A. A. // Phillip. J. Sci. – 1996. – Vol. 125, № 4. – P. 271-289.
  23. Priya E. Genotoxic effect of an organophosphorous pesticide on *Allium* root meristems *in vivo* / Priya E., Joyce S., Gowrishankar B., Rajaiah D. // Indian J. Exp. Biol. – 1996. – Vol. 34, № 4. – P. 320-324.
  24. Куринный А.И. Индикация загрязнения окружающей среды пестицидами-мутагенами по их гаметоидному действию на растения / Куринный А.И. // Цитол. и генетика. – 1988. – Т. 17. – № 4. – С. 32-35.
  25. Скоблин В.П., Козлова П.В. Цитогенетическая оценка действия солей марганца и цинка с гербицидом 2М-4ХП / В.П. Скоблин, П.В. Козлова // Цитол. и генетика. – Т. 25. – № 2. – С. 21-23.
  26. Сидоров В.П. Изучение мутагенной активности 2,4-Д-натриевой соли на клетках скерды и сосны обыкновенной / В.П. Сидоров, К.Д. Мухамедшин, Т.И. Кудрявцева, В.А. Попова // Генетика. – 1989. – Т. 25. – № 4. – С. 161-165.
  27. Ибрагимова Э.Э. Экологическая и фитотоксическая оценка загрязнения сельскохозяйственных почв Крыма пестицидами и тяжелыми металлами / Э.Э. Ибрагимова // Ученые записки Таврического нац-го ун-та им. В.И. Вернадского (серия «Биология, химия»). – 2007. – Т. 20 (59). – № 2. – С. 16-25.
  28. Дарлингтон С.Д., Ла Кур Л.Ф. Хромосомы. Методы работы / Под ред. Н.Н. Воронцова. – М.: Атомиздат, 1980. – 216 с.
  29. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений / З.П. Паушева. – М.: Колос 1980. – 304 с.
  30. Довгалюк А.И. Оценка фито- и цитотоксической активности соединений тяжелых металлов и алюминия с помощью корневой апикальной меристемы лука / А.И. Довгалюк, Т.Б. Калиняк, Я.Б. Блюм // Цитол. генетика. – 2001. – № 1. – Т. 35. – С. 3-9.
  31. Довгалюк А.И. Цитогенетические эффекты солей тяжелых металлов в клетках апикальной меристемы корней проростков *Allium cepa* L. / А.И. Довгалюк, Т.Б. Калиняк, Я.Б. Блюм // Цитол. и генетика. – 2001. – № 2. – Т. 36. – С. 3-9
  32. Евсеева Т.И. Токсические и цитогенетические эффекты, индуцируемые у *A. cepa* низкими концентрациями Cd и <sup>232</sup>Th / Т.И. Евсеева, Т.А. Майстренко, С.А. Гераськин, Е.С. Белых, Е.В. Казакова // Цитол. и генетика. – 2005. – № 5. – С. 73-80.
  33. Ибрагимова Э.Э. Митотическая активность клеток корневой меристемы *Allium cepa* L. при совместном действии пестицидов и тяжелых металлов / Э.Э. Ибрагимова // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «биология, химия». – 2014. – Т. 27 (66), № 1. – С. 56-63.
  34. Плохинский Н.А. Биометрия / Н.А. Плохинский. – М.: МГУ, 1970. – 367 с.

35. Strunnikov A.V. SMC proteins and chromosome structure / A.V. Strunnikov // Trends Cell Biol. – 1998. – № 8. – P. 454-459.
36. Fiskesj G. Allium test / Fiskesj G. // Methods in Molecular Biology – 43. In Vitro Toxicity Testing Protocols / Ed. S. O'Hare and C. K. Atterwill – Totowa, NJ: Copyright Humana Press Inc. – 1995. – P. 119-127.
37. Полещук Н.А. Цитологический анализ токсического действия гербицида трефлана на клетки развивающегося корешка ярового ячменя *Hordeum vulgare* L. / Н.А. Полещук // Ломоносов – 2006: XIII междунар. конф. студ., аспирантов и молодых ученых, секция «Биология»; 12-15 апр. 2006 г., Москва, МГУ, Биол. ф-т: Тез. докл. / Сост. Коновалов Ф.А. – М.: МАКС ПРЕСС, 2006. – С. 180-181.
38. Малецкий С.И. Генетическая изменчивость в популяциях соматических клеток и ее влияние на репродуктивные признаки у покрытосеменных растений / С.И. Малецкий, Я.С. Колодяжная // Успехи совр. биологии. – 1999. – Т. 119. – № 2. – С. 128-143.

**RESEARCH OF COMBINED EFFECTS OF RESIDUAL AMOUNTS OF PESTICIDES AND HEAVY METALS ONTO THE FREQUENCY OF CELL MUTATIONS OF *ALLIUM CEPA* L. ROOT MERISTEM**

*Ibragimova E.E.*

*Crimean Engineering-Pedagogical University, Simferopol, Russia  
E-mail: evelina\_biol@mail.ru*

The article deals with the results of research of combined effects of residual amounts of pesticides and heavy metals onto the frequency of cell mutations of *Allium cepa* L. root meristem. The analysis of the data allows to reach the conclusion, that in agricultural soils, located along motorways, the progressing accumulation of heavy metals forming complexes with residual amounts of pesticides is observed the effect of which depends on concentration and is accompanied by decrease of mitotic activity.

According to the experiment, highly concentrated heavy metals together with residual amounts of pesticides prove to cause the evident negative cytogenetic reaction on *Allium cepa* test-system. The tested pollutants demonstrate the high capability to cause the violations of a mitosis connected with the damage of the mitotic system than the violations connected with damage and violation of chromosome structure.

**Keywords:** heavy metals, residual amounts of pesticides, chromosomal violations, *Allium cepa* L.

**References**

1. Inomata O.N.K., Lemes Vera R.R., Baretto H.H.C. Avaliação dos teores de endossulfan em diferentes profundidades do solo, Rev. Inst. A. Lutz., 56, 2 (1996), p. 53.
2. Kookana R.S., Simpson B.W. Pesticide fate in farming systems: Research and monitoring: *Abstr. International Symposium in Soil and Plant Analysis „Opportunities for the 21st Century: Expanding the Horizons for Soil, Plant and Water Analysis”*, Brisbane, March 22-26, 1999. Commun. Soil Sci. and Plant Anal., 31, 11–14 (2000), p.1641.
3. Melnikov N.N., Belan S.R., Comparative danger of pollution of the soil herbicides, *Agrochemistry*, 2 (1997), p. 66.
4. Vencill W.K., Radcliffe D.E., Cabrera M.L., Endale D., Steiner J.L., Schomberg H.H., Herbicide surface runoff and leaching from a cotton-rye cropping system under contrasting tillage and nutrient management levels, *Brighton Conf. “Weeds”: Proc. Int. Conf.* (Farnham, Brighton, 1999), p. 663.

5. Ortega M., Villarroya M., Montero G. Respuesta de *Pinus halepensis* Mill y *Pinus pinaster* Ait. a herbicidas en condiciones de vivero, *Invest. agr. Sist.y recurs. Forest.*, 9, 1 (2000), p. 137.
6. Wojdyla A.T. Efficacy of fungicides in the control of *Sphaerotheca pannosa* var. *rosal* on greenhouse rose cultivars and their influence on the growth of plants, *J. Plant Prot. Res.*, 40, 1 (2000), p. 60.
7. Mattina M.J.I., Iannucci-Berger W., Dykas L. Chlordane uptake and its translocation in food crops, *J. Agr. and Food Chem.*, 48, 5 (2000), p. 1909.
8. Sawicka B., Dialo A.S. Ciemnienie mięszu bulw surowych ziemniaka w warunkach stosowania herbicydu Sencor 70 WP, *Biul. Inst. hod.: aklim. rosl.*, 203 (1997), p. 187.
9. El-Kabbany S., Rashed M.M., Zayed M.A. Monitoring of the pesticide levels in some water supplies and agricultural lands, in El-Haram, Gisa (A.R.E.), *J. Hazardous Mater*, 72, 1 (2000), p. 11.
10. Pesticides on a choice, *Protection of plants*, 2 (2001), p. 1.
11. Pilinskaya M. A. Mutagen effect of pesticides, Results of science and equipment. Series general genetics: *Chemical mutagenesis*, 9 (1986), p. 97.
12. Lisovy M.P. Integrations of protection of plants and possibility of alternative (biological) agriculture in Ukraine, *Agrarian science*, 9 (1997), p. 37.
13. Kamegama H. Influence of instruments of environmental policy on development of the agricultural technology sparing environment. Theory and practice, *Kagawa daigaku nogakubu gakujutsu hokoku = Techn. Bull. Fac. Agr. Kagawa Univ.*, 50, 1 (1998), p. 17.
14. Shapkin V.A., Demurina A.K., Kryukova L.I. Influence of a Chlorsulfuron on the content of phosphoric connections in roots of sprouts of a cotton, *Uzbek biological magazine*, 4 (1992), p. 21.
15. Chung R.A., Williams C.S. Synthesis and aminoacyl transfer RNA activity of L-2071 cells exposed to dieldrin and DDT, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 15 (1986), p. 581.
16. Kriton K., Hatrios L., Howe M. Influence of herbicides hexazone and chlorsulfuron on the metabolism of isolated soybean leaf cells, *Pestic. biochem and Physiol.*, 3 (1988), p. 17.
17. Entsova T.A., Lyapkov N.S., Niun Wang N.T., Petrova T.V. Cytological studying of effect of herbicides in in vitro system at peas, *Genetics*, 29, 8 (1992), p. 26.
18. Voskanyan F.Z., Avakyan V.A. Cytogenetic effect of an aromethrin on the chromosomal device of *Crepis capillaries*, *Biological magazine of Armenia*, 37, 2 (1984), p. 93.
19. Popov P., Popov N. Influence of pesticide Raundap on intensity of a cellular reproduction and the course of a mitosis in *C. capillaries* cages, in G<sub>1</sub> period, *Biology*, 25, 6 (1987), p. 287.
20. Grigorenko N.V., Larchenko E.A. Cytogenetic effect of herbicide of a titus on corn, *The 4<sup>th</sup> Congress of Society of physiologists of plants of Russia. The international conference "Physiology of Plants" – 2*, (Moscow, 1999), p. 557.
21. Butani J.V., Shukla P.T. Cytological effects of pesticides on onion (*Allium cepa* L.) root tip, *Gujarat. Agr. Univ. Res. J.*, 20, 1 (1994), p. 60.
22. Arif M., Vahidy A.A. Toxicity of fungicides Nimrod and Dithane M-45 on mitotic cells of *Allium cepa* L., *Phillip. J. Sci.*, 125, 4 (1996), p. 271.
23. Priya E., Joyce S., Gowrishankar B., Rajaiah D. Genotoxic effect of an organophosphorous pesticide on *Allium* root meristems in vivo, *Indian J. Exp. Biol.*, 34, 4 (1996), p. 320.
24. Kurinny A.I. Indication of environmental pollution by pesticides mutagens on their gametotic action on Plant, *Cytology and genetics*, 17, 4 (1998), p. 32.
25. Skoblin V.P., Kozlova P.V. Cytogenetically an assessment of effect of salts of manganese and zinc with herbicide 2M-4HP, *Cytology and genetics*, 25, 2 (1994), p. 21.
26. Sidorov V.P., Mukhamedshin K.D., Kudryavtseva T.I., Popova V.A. Studying of mutagen activity 2,4-D on cages of a pine ordinary, *Genetic*, 25, 4 (1989), p. 161.
27. Ibragimova E.E. Ecological and phytotoxic assessment of pollution of agricultural soils of the Crimea pesticides and heavy metals, *Scientific notes of Taurida national univ. of V.I. Vernadsky (Biology, Chemistry series)*, 20 (59), 2 (2007), p. 16.
28. Darlington S.D., La Cour L.F. *Chromosomes. Work methods*, Under the editorship of N.N. Vorontsov, 216 p. (Atomizdat, Moscow, 1980).
29. Pausheva Z. P. *Practicum on cytology of plants*, 304 p. (Ear, Moscow, 1980).
30. Dovgalyuk A.I., Kalinyak T.B., Blum Ya.B. Assessment of phyto- and cytotoxic activity of compounds of heavy metals and aluminum by means of a root meristem of onions, *Cytology and genetics*, 35, 1 (2001), p. 3.

31. Dovgalyuk A.I., Kalinyak T.B., Blum Ya.B. Cytogenetic effects of salts of heavy metals in cages of meristem of roots of sprouts of *Allium cepa* L., *Cytology and genetics.*, 36, 2 (2001), p. 3.
32. Evseeva T.I., Maystrenko T.A., Geraskin S.A., Belykh E.S., Kazakova E.V. The toxic and cytogenetic effects induced at *A. cepa* by low concentration of Cd and <sup>232</sup>Th, *Cytology and genetics*, 5 (2005), p. 73.
33. Ibragimova E.E. Mitotic activity of cages of a root meristem of *Allium cepa* L. at joint effect of pesticides and heavy metals, *Scientific notes of Taurida national univ. of V.I. Vernadsky (Biology, Chemistry series)*, 27 (66), 1 (2014), p. 56.
34. Plokhinsky N.A. *Biometriya*, 367 p. (MGU, Moscow, 1970).
35. Strunnikov A.V. SMC proteins and chromosome structure, *Trends Cell Biol.*, 8 (1998), p. 454.
36. Fiskesj G., Ed.S. O'Hare and C.K. Atterwil Allium test, Methods in Molecular Biology – 43. *In Vitro Toxicity Testing Protocols* (1 – Totowa, NJ: Copyright Humana Press Inc., 1995), p. 119.
37. Poleshchuk N.A. Cytological analysis of toxic effect of herbicide of a treflan on cell root of *Hordeum vulgare* L. *Lomonosov – 2006: XIII international conference of students, graduate students and young scientists, section "Biology"*, (MAX. PRESS, Moscow, MGU, 2006), p. 180.
38. Maletsky S.I., Kolodyazhnaya Ya.S. Genetical variability in populations of somatic cages and its influence on reproductive signs at angiospermous plants, *Achievements of modern biology*, 119, 2 (1999), p. 128.

Поступила в редакцию 14.10.2014 г.

УДК 612 – 591.1

## ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ПРИ ИНДУЦИРОВАННОМ ВОСПАЛИТЕЛЬНОМ ПРОЦЕССЕ НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ

*Иваненко М.О.*

*Государственное учреждение «Институт медицинской радиологии С.П. Григорьева НАМН  
Украины», Харьков, Украина  
E-mail: ivanenko-mar@mail.ru*

Проанализированы закономерности изменения первичного звена иммунорезистентности – фагоцитарной активности нейтрофилов и изменения ферментативной функции фагоцитов в НСТ-тесте; изменения уровней иммуноглобулина А на модели индуцированного липополисахаридом воспаления у экспериментальных животных разного возраста.

**Ключевые слова:** сыворотка крови, фагоцитоз, иммуноглобулин А, факторы резистентности.

### ВВЕДЕНИЕ

На фоне меняющихся условий окружающей среды, увеличение бактериальной и вирусной инфекций возросло количество болезней цивилизации (сахарный диабет, злокачественные новообразования), которые связаны с развитием дисбактериоза, хронических и воспалительных реакций [1, 2].

Клиническая значимость воспаления проявляется, когда имеет место преобладание раздражения над физиологической реактивностью, что в конечном счете приводит к гипертрофии данного процесса, переходящего в гиперболизированную форму [3].

Существует концепция о воспалительном процессе как исключительно компенсаторной реакции, возникающей в условиях функционально недостаточной активности нейтрофильного фагоцитоза в связи с наличием в тканях агрессивных факторов, которые не могут быть устранены мерами физиологического реагирования этой защитной системы [4].

В случае преобладания уровня антигенов и токсинов над потенциальной функциональной активностью фагоцита наступает его гиперстимуляция и образующиеся при этом токсичные продукты метаболизма фагоцита (реактивные метаболиты кислорода и ферменты) усугубляют микробное повреждение тканей первичного очага. Важнейшую роль в борьбе с антигенами играет способность фагоцитов к завершённому фагоцитозу.

И.И.Мечников, рассматривал воспаление как совершенную защитно-приспособительную реакцию организма на повреждающий фактор, и его теория получила дальнейшее развитие в работах современных исследователей,

рассматривающих воспалительный процесс как защитную реакцию, нередко переходящую в повреждение [5].

И.И.Мечников отвёл фагоцитам ведущую роль в борьбе с инфекционными заболеваниями, он утверждал, что «...иммунитет в инфекционных болезнях должен быть приписан активной цитологической деятельности. Среди клеточных элементов фагоциты должны занять первое место. Чувствительность и подвижность, способность поглощать твердые тела и вырабатывать вещества, могущие разрушать и переваривать микробов — вот главные факторы деятельности фагоцитов. Если эти свойства в достаточной мере развиты и парализуют патогенное действие микробов, тогда животное от природы иммуно ... когда фагоциты не обнаруживают наличия всех или одного из этих свойств в достаточной степени, то животное восприимчиво к инфекции...» [6].

Дальнейшее развитие науки показало, что фагоцит осуществляет элиминацию не только патогенных микробов, но и всего чужеродного с антигенными свойствами, что может внедриться или возникнуть в макроорганизме. Это дало основание академику Р.В. Петрову дать следующее определение иммунитета: «Иммунитет – способ защиты организма от живых тел и веществ, несущих на себе признаки генетической чужеродности» [7].

В целом можно сказать, что иммунитет осуществляет защиту организма от проникновения чужеродных экзогенных (микробов) или возникновения чужеродных эндогенных агентов, то есть осуществляет в основном антиинфекционную и противоопухолевую защиту. В этом заключается сущность иммунологического надзора, выполняемого клетками иммунной системы [8]. Целью работы явилась оценка особенностей взаимодействия первичных клеточных и вторичных гуморальных иммунофизиологических факторов резистентности при индуцированном воспалительном процессе на экспериментальной модели.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В нашей работе экспериментальные исследования были выполнены на 3- и 22-месячных белых беспородных крысах-самцах. Всего в работе использованы 200 животных массой 140–240 г. Контрольной группой служили животные такого же возраста, что и подопытные крысы. Животные содержались в условиях стандартного светового и пищевого режима (вода и еда *ab libitum*).

Исследования проводили в соответствии с «Общими этическими принципами проведения экспериментов на животных» (Украина, 2001 г.), которые согласуются с положениями европейской конвенции «О защите позвоночных животных, которые используются для экспериментов и других научных целей» (Страсбург, 1986 г.) [9 - 11].

Воспроизводили воспаление и дисбиоз в тонкой кишке внутрибрюшинными инъекциями липополисахарида (ЛПС) (препарат липополисахаридов из *Escherichia coli* штамм 0111:B4 (“Sigma” США), в расчете 100 мкг /кг массы тела в 1 мл изотонического раствора NaCl. Введение бактериального липополисахарида экспериментальным животным является моделью, позволяющей индуцировать воспалительные реакции [12]. В ходе эксперимента определяли фагоцитарную активность нейтрофилов методом завершённого фагоцитоза с тест-культурой,

производили определение общей окислительно-восстановительной активности нейтрофилов в тесте восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест) и определяли количество иммуноглобулина А (Ig А) турбодиметрическим методом. Материалом для исследования служили сыворотка крови и форменные элементы крови экспериментальных животных. Полученные результаты обрабатывались общепринятыми методами вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента (пакет программ БИОСТАТ версия 4.03).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Фагоцитарный индекс (ФИ) и фагоцитарное число (ФЧ) у контрольных крыс разного возраста достоверно не различались. ФИ соответствовал  $(81,17 \pm 5,4) \%$  и  $(82,33 \pm 5,4) \%$ , а ФЧ составляло  $3,62 \pm 0,20$  усл. ед. и  $3,71 \pm 0,20$  усл. ед. у 3- и 22-месячных крыс, соответственно. Индекс завершенности (ИЗ) фагоцитоза у 3-месячных животных был достоверно выше по сравнению с этим показателем 22-месячных крыс ( $1,44 \pm 0,03$  усл. ед. против  $1,13 \pm 0,03$  усл. ед.) (табл.1). У 3-месячных крыс с модельным воспалением ФИ и ФЧ достоверно не различались от данных показателей у контрольных животных этого же возраста (см.табл. 1).

Индекс завершенности фагоцитоза у 3-месячных крыс с воспалением был достоверно ниже контрольных величин и составлял  $1,25 \pm 0,03$  усл. ед. У 22-месячных животных с моделью воспаления все исследуемые показатели активности нейтрофилов были ниже, чем у контрольных крыс (см.табл.1).

Таблица 1.

#### Функциональная активность нейтрофилов у контрольных животных и у животных с моделью воспаления

Возраст крыс	Животные					
	Контрольные			С моделью воспаления		
	ФИ, %	ФЧ, усл. ед.	ИЗ, усл. ед.	ФИ, %	ФЧ, усл. ед.	ИЗ, усл. ед.
3 мес.	$81,17 \pm 5,40$	$3,62 \pm 0,20$	$1,44 \pm 0,03$	$76,71 \pm 5,40$	$3,71 \pm 0,20$	$1,25 \pm 0,03^*$
22 мес.	$82,33 \pm 5,40$	$3,71 \pm 0,20$	$1,13 \pm 0,03$	$66,84 \pm 5,40^*$	$2,86 \pm 0,20$	$0,95 \pm 0,03^{*x}$

Примечания. Различия достоверны: 1) \* – по сравнению с контролем,

2) <sup>x</sup> – между возрастными группами,  $P < 0,05$ .

Индекс завершенности фагоцитоза у 3-месячных крыс с воспалением был достоверно ниже контрольных величин и составлял  $1,25 \pm 0,03$  усл. ед. У 22-месячных животных с моделью воспаления все исследуемые показатели активности нейтрофилов были ниже, чем у контрольных крыс (см. табл. 1). Полученные нами данные о незавершенности реакций фагоцитоза у 3-месячных крыс с моделью воспаления свидетельствуют о диссоциации процессов поглощения и переваривания у данных животных. У 22-месячных крыс наблюдается снижение

активности нейтрофилов на всех этапах фагоцитоза. Таким образом, разрешенность воспаления зависит от возрастных особенностей течения воспалительных реакций.

**Показатели НСТ-теста у экспериментальных животных с моделью воспаления в разных возрастных группах**

При исследовании метаболической активности нейтрофилов с помощью НСТ-теста у контрольных животных было обнаружено более высокое значение индекса стимуляции (ИС) у 3-месячных по сравнению с этим показателем у 22-месячных крыс (рис. 1).

У 3- и 22-месячных экспериментальных животных с моделью воспаления наблюдалось повышение метаболической активности нейтрофилов. У животных с моделью воспаления обеих возрастных групп средний цитохимический коэффициент спонтанный (СЦК сп) и средний цитохимический коэффициент стимулированный (СЦК ст) были выше по сравнению с показателями контрольных групп (рис. 2).

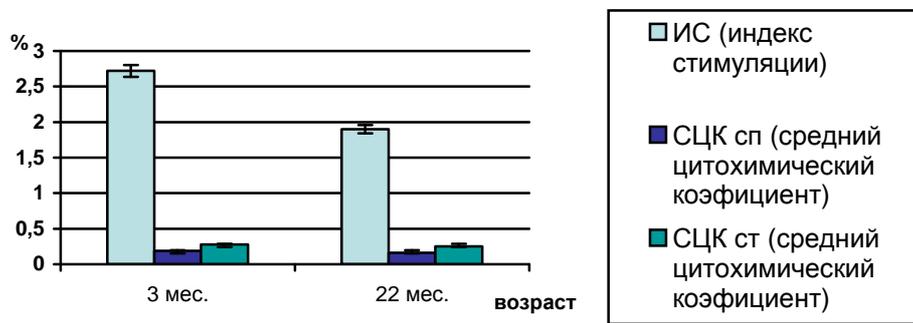


Рис. 1. Показатели НСТ-теста у контрольных животных 3 и 22- месячного возраста

При этом показатель ИС у животных с моделью воспаления был ниже по сравнению с контролем, что может свидетельствовать о наступлении у этих животных фазы супрессии или истощения функциональной активности нейтрофилов.

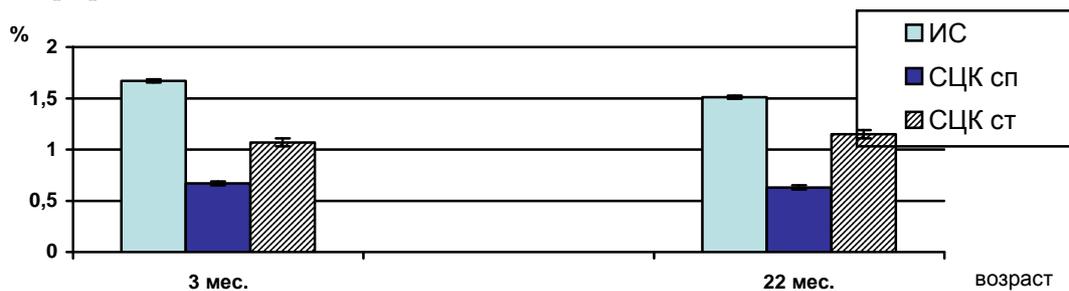


Рис. 2. Показатели НСТ-теста у животных 3- и 22-месячного возраста с моделью воспаления

**Оценка содержания иммуноглобулина А в сыворотке 3- и 22-месячных контрольных животных и животных с моделью воспаления**

В организации адаптивного иммунного ответа на поверхности слизистой оболочки эпителиальные клетки принимают активное участие. Эта функция включает взаимодействие клеток эпителия с антигенпрезентирующими и другими лимфатическими клетками. В захвате из просвета полости антигенов активное участие принимают включенные в эпителиальные фолликулы М-клетки, которые далее представляют захваченные иммуногены лимфоидным тканям слизистой оболочки, которые могут формировать на них иммунные реакции [13,14].

Отсутствие у М-клеток прикрывающего гликокаликса способствует захвату ими комменсальных бактерий и представлению их дендритным клеткам (DC), в которых небольшое количество бактерий может выживать и вызывать Т-клеточные независимые Ig A реакции [15, 16].

Сывороточный иммуноглобулин А (IgA) составляет 10-15% от общего количества иммуноглобулинов. К иммуноглобулинам класса А относятся антитела, обеспечивающие местный иммунитет: защита желудочно-кишечного тракта, дыхательных и мочеполовых путей от инфекций.

Микрометод определения содержания сывороточного иммуноглобулина класса А основан на иммунологическом феномене преципитации. Антигены (в данном случае иммуноглобулины исследуемой сыворотки) образуют прочные иммунные комплексы с антителами (моноспецифические сыворотки против иммуноглобулинов).

Исследование концентрации Ig А в сыворотке показало снижение этого показателя в обеих группах животных с моделью воспаления относительно контрольных значений. Более выраженное снижение отмечено у 3-месячных крыс ( $0,42 \pm 0,05$  г/л против  $1,30 \pm 0,09$  г/л в контроле) (рис. 3.). Снижение концентрации Ig А может свидетельствовать о недостаточности гуморального звена иммунитета, а также адсорбции его на иммунных комплексах [17, 18].

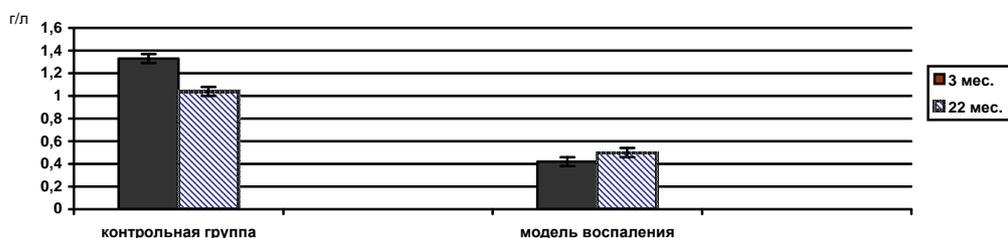


Рис. 3. Содержания Ig А в сыворотке 3- и 22-месячных контрольных животных и животных с моделью воспаления

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Результаты исследования свидетельствуют о нарушении первичной клеточной и вторичного гуморального звена иммунитета при старении организма и снижении

адаптивных реакций иммунной системы при воспалении вследствие увеличения антигенного воздействия.

1. Все исследуемые показатели фагоцитарной активности нейтрофилов у 22-месячных животных с моделью воспаления были ниже чем у контрольных крыс этого возраста. Фагоцитарное число и фагоцитарный индекс нейтрофилов у 3-месячных крыс с моделью воспаления достоверно не отличались от контрольных показателей, а индекс завершенности фагоцитоза был достоверно ниже по сравнению с контролем.
2. Снижение резервных возможностей фагоцитирующих клеток было более выражено у 22-месячных животных. Метаболическая активность нейтрофилов была выше, а метаболический резерв этих клеток меньше у 3- и 22-месячных крыс с моделью воспаления по сравнению с показателями контрольных групп.
3. Уровни иммуноглобулина А в сыворотке крови 3- и 22-месячных крыс с моделью воспаления были снижены по сравнению с этим показателем у контрольных животных.

### Список литературы

1. Бережная Н.М. Иммунология злокачественного роста. / Н.М. Бережная, В.Ф. Чехун– Киев, Наукова думка, 2005. – 790 с.
2. Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология. / Дранник Г.Н. – Киев., 2010. – 552 с.
3. Поликар А. Воспалительные реакции и их динамика: биология, патология и фармакодинамика: Пер. с франц. / Поликар А. — М.: Новосибирск, 1969. – 95 с.
4. Маянский Д.Н. Роль нейтрофилов в ишемическом и реперфузионном повреждении миокарда / Д.Н. Маянский, С.Д. Маянская // Тер. архив. – 2001. – № 12. – С. 84– 88.
5. Цуман В.Г. Гнойно-септические осложнения острых хирургических заболеваний у детей / В.Г. Цуман, А.Е. Машков – М.: ОАО «Медицина», 2005. – 288 с.
6. Мечников И.И. Лекции о сравнительной патологии воспаления, читанные в апреле и мае 1891г. в Пастеровском Институте / Мечников И.И. – СПб.: К. Л. Риккера, – 1892. – 162 с.
7. Петров Р.В. Иммунология / Петров Р.В. – М.: Медицина, – 1987. – 414 с.
8. Волянский Ю.Л. Развитие идей И.И. Мечникова в современном естествознании. / Ю.Л. Волянский, Р.М. Хаитов, В.И. Мальцев // Здоров'я України Мед. газета України – 2005.– №10 (199) – С. 60–61.
9. Врачебные ассоциации, медицинская этика и общемедицинские проблемы // Сборник официальных документов. – М.: Медицина, 1995. – С. 7
10. Комаров Ф.И. Роль проблемной комиссии «Хронобиология и хрономедицины» РАМН в развитии внутренней медицины / Ф.И. Комаров, С.И. Рапорт, С.М. Чибисов // Клиническая медицина. – 2007. – №9. – С. 14–16.
11. Кундиев Ю. И. Состояние биоэтики в Украине / Ю. И. Кундиев // Медичний Всесвіт. – 2006. – Т. II, № 1 – 2. – С.41–46.
12. Dantzer R. Cytokine-induced sickness behavior: mechanisms and implications / R. Dantzer // Ann. N Y acad. Sci. – 2001. – Vol. 933. – P. 222–234.
13. Sansonetti P. War and peace at mucosal surfaces / P. Sansonetti // Immunology. – 2004. – Vol. 4 – P. 953–964.
14. Pamer E.C. Immune responses to commensal and environmental microbes/ E.C. Pamer // Nat. Immunol. – 2007. – Vol. 8 (11) – P. 1173–1178.
15. Neutra M.R. Microbial pathogenesis and the intestinal epithelial cell. / M.R. Neutra, P. Sansonetti //ASM Press. Washington DC. – 2003. – P. 23–42.
16. Rakoff-Nahoum S. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors for intestinal homeostasis. / S. Rakoff-Nahoum, J. Paglino, F. Esmali-Varzaeh, et al. //Cell. – 2004. – Vol. 118 (2) – P. 229–241.

17. Лебедев К.А. Иммунограмма в клинической практике (введение в прикладную иммунологию) / К.А. Лебедев, И.Д. Понякина // М.: Наука. – 1990. – 224 с.
18. Бондаренко В.М. Механизмы транслокации бактериальной аутофлоры в развитии эндогенной инфекции / В.М. Бондаренко // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН (электронный журнал). – 2013. – №3 – С. 1–21.

## FEATURE IMMUNORESISTANCE IN INDUCED INFLAMMATORY PROCESSES IN EXPERIMENTAL MODELS

*Ivanenko M.O.*

*State Institution «Grigoriev Institute for Medical Radiology of National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kharkiv, Ukraine  
E mail: ivanenko-mar@mail.ru*

Analyzed patterns of change in primary care immunoresistance - phagocytic activity of neutrophils and changes in enzymatic function of phagocytes in HCT-test; changes in the levels of immunoglobulin A model of lipopolysaccharide-induced inflammation in experimental animals of different ages. Our data reveal a violation of the primary cell and secondary humoral immunity in aging and reduce adaptive responses of the immune system during inflammation by increasing the antigenic influence.

Phagocytic number and phagocytic index of neutrophils in 3-month rat model of inflammation was not significantly different from the targets, and an index of completion of phagocytosis was significantly lower compared with controls. All parameters studied neutrophil activity in 22-month-old animal models of inflammation were lower than the control rats in this age. Observed an increase in metabolic activity of neutrophils and reduce their metabolic reserve in 3- and 22-month-old rat model of inflammation compared with control groups. Reducing the reserve capacity of phagocytic cells was more pronounced in 22- month-old animals. The levels of immunoglobulin A in serum of the third 22-month rat model of inflammation was reduced compared with that in the control animals.

The findings suggest that the age characteristics of the primary violations of the cell and secondary humoral immunity and reduction of adaptive responses of the immune system during inflammation by increasing the antigenic influence.

The assessment we conducted the primary indicators of nonspecific resistance and humoral immunity secondary indicators identified various adaptive responses in young and old animals.

**Keywords:** blood serum, phagocytosis, immunoglobulin A resistance factors.

### References

1. Gentle N.M., Chehun V.F. Immunology of malignant growth, Kiev, Naukova dumka, 2005, 790 p.
2. Drannik G.N. Clinical Immunology and Allergology, Kiev, 2010, 552 p.
3. Polícar A. Inflammatory reactions and their dynamics: biology, pathology and pharmacodynamics, Per. with France. M.: Novosibirsk, 1969, 95 p.
4. Mayansky D.N., Mayanskaya S.D. Role of neutrophils in the ischemic and reperfusion injury of the myocardium, Ter. Archive, 2001, No. 12, pp. 84-88.

5. Cuman V.G., Mashkov A.E. CUM VG septic complications of acute surgical diseases in children M.: JSC "Medicina", 2005, 288 p.
6. Mechnikov I.I. Lectures on the comparative pathology of inflammation, read in April and May 1891. at the Pasteur Institute, SPb.: Rikhera K. L., 1892, 162 p.
7. Petrov R.V. Immunology M.: "Medicina", 1987, 414 p.
8. Volyansky Yu.L., Khaitov R.M., Maltsev V.I. Development of ideas Mechnikov in modern science, Health Protection of Ukraine Med. Ukrainian newspaper, 2005, No. 10 (199), pp. 60-61.
9. Doctors Association, medical ethics and medical problems, Collection of official documents, M.: "Medicina", 1995, pp. 7
10. Komarov F.I., Report S.I., Chibisov S.M. Role Problem Commission "Chronobiology and chronomedicine" RAMS in the development of internal medicine, Clinical Medicine, 2007, No. 9, pp. 14-16.
11. Kundiev Y.I. Condition of bioethics in Ukraine, Medichny Vsesvit, 2006, vol.II, No. 1-2, pp. 41-46.
12. Dantzer R. Cytokine-induced sickness behavior: mechanisms and implications, Ann. N Y Acad. Sci., 2001, vol. 933, pp. 222-234.
13. Sansonetti P. War and peace at mucosal surfaces, Immunology, 2004, vol. 4, pp. 953-964.
14. Pamer E.C. Immune responses to commensal and environmental microbes, Nat. Immunol., 2007, vol. 8 (11), pp. 1173-1178.
15. Neutra M.R., Sansonetti P. Microbial pathogenesis and the intestinal epithelial cell, ASM Press. Washington D.C., 2003, pp. 23-42.
16. Rakoff-Nahoum S., Paglino J., Esmali-Varzaeh F., et al. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors for intestinal homeostasis, Cell, 2004, vol. 118 (2), pp. 29-241.
17. Lebedev K.A., Ponyakina I. D. Immunogram in clinical practice (introduction to applied immunology), M.: Nauka, 1990, 224 p.
18. Bondarenko V.M. Mechanisms of bacterial translocation in the development of endogenous autoflora infection, Bulletin of the Orenburg Scientific Center, Ural Branch of Russian Academy of Sciences (e-zine), 2013, No. 3, pp. 1-21, <http://elmag.uran.ru>.

*Поступила в редакцию 24.10.2014 г.*

**УДК 581.93:502.72(477.75)**

## **ДИНАМИКА ПЕРВИЧНОЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ СТЕПНЫХ ФИТОЦЕНОЗОВ ОПУКСКОГО ПРИРОДНОГО ЗАПОВЕДНИКА**

*Кобечинская В.Г., Отурина И.П., Котолуп М.В.*

*Таврический национальный университет имени В.И. Вернадского, Симферополь, Республика  
Крым, Российская Федерация  
E-mail: valecohome@mail.ru*

Проанализирована природно-антропогенная динамика продукционного процесса в степных фитоценозах Опуцкого природного заповедника за 10-летний период (2002-2012 гг). В результате многолетних наблюдений за показателями изменения состава, строения и продуктивности растительных сообществ на пяти пробных участках выявлены тенденции трансформации растительного покрова. В сравнительном аспекте показаны последствия воздействия пастбищной дигрессии, пожаров, демутиационных процессов, вызывающих изменения в фитоценозах, функционирующих после введения заповедного режима.

**Ключевые слова:** биологическая продуктивность, степные фитоценозы, Опуцкий природный заповедник, динамика фитомассы, энергетический потенциал подстилки.

### **ВВЕДЕНИЕ**

Растительность Опуцкого природного заповедника (ОПЗ), учрежденного в 1998 г., представлена богатым и оригинальным набором фитоценозов, что в настоящее время является редкостью для Керченского полуострова, на большей части которого преобладают антропогенные ландшафты. Сформировавшиеся на сравнительно небольшой территории заповедника (1592,3 га) биогеоценозы отражают многообразие ландшафтов восточного Крыма. Флористическое богатство ОПЗ обусловлено значительной пространственной и временной гетерогенностью условий среды [3]. В ОПЗ произрастает 452 вида высших сосудистых растений из 244 родов, принадлежащих к 62 семействам, что составляет 14,4 % видового состава флоры Крыма и почти 41,8 % флоры всего Керченского полуострова, в том числе 6,0 % (27 видов) – крымские эндемы [1, 2].

На территории ОПЗ хорошо прослеживается многовековое воздействие антропогенного фактора: остатки античных городищ, многоярусные туннели, образовавшиеся после подземной добычи камня при строительстве древнего Пантикапея, а впоследствии и современной Керчи. С другой стороны, благодаря длительному пребыванию территории заповедника в составе военного объекта – испытательного полигона «Чауда», здесь в достаточно хорошем состоянии сохранилась коренная растительность, представленная, главным образом, настоящими и петрофитными степями с фрагментами кустарниковой

растительности, саванноидами, томиллярами, а также кальцепетрофитонными и галофильными комплексами [4, 5].

Целью настоящего исследования явилось изучение динамики первичной биологической продуктивности степных фитоценозов ОПЗ для выявления тенденций демулационных процессов современного развития растительного покрова после введения заповедного режима. В процессе изучения продукционного процесса степей особое внимание уделено подстилке, объединяющей абиотическую и биотическую составляющие биогеоценоза в целостную систему [6, 7, 8]. Количество подстилки – важнейшего компонента любого растительного сообщества – наиболее объективный показатель в оценке интенсивности круговорота веществ с учетом климатических факторов, поэтому выявление энергетического запаса подстилки степей ОПЗ, впервые выполненное для этого региона, представляет большой научный интерес.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сравнительная оценка динамики продуктивности заповедных степных фитоценозов проводилась на основе авторских данных, полученных в процессе исследований в 2002, 2011 и 2012 гг. Для изучения демулационных процессов в степных фитоценозах при снятии пастбищных нагрузок после учреждения заповедника в 2002 г. был заложен профиль от верхнего плато горы Опук на юг к морю шириной 100 м с перепадом высот от 50 до 150 м. По профилю хорошо прослеживается активная мезофитизация растительности из-за образования мощной подстилки, особенно по балкам, главенствующим в рельефе. Вдоль него были выделены 3 ленточные пробные площади по 100 м<sup>2</sup> (участки №№ 1, 2, 3). Участки №№ 4 и 5 (горельники) располагались вблизи границы заповедника на северном склоне горы на высоте 30 и 75 м.

Геоботаническое описание фитоценозов на пяти пробных площадях проведено с использованием общепринятых геоботанических методик [9, 10]. Сбор материала с каждого участка осуществлялся укосным методом в 10-кратной повторности в период максимального развития травостоя (начало июня). Растительные пробы доводили до абсолютно сухого веса в камеральных условиях в лаборатории с последующим разбором фитомассы по видам, которые объединяли в агробиологические группы, выделяя ветошь и подстилку [11].

Энергетический потенциал сухой подстилки рассчитывали по формуле:

$$E_b = 4,5 \text{ ккал/г} \times M,$$

где  $E_b$  – энергия биомассы, 4,5 ккал – энергия 1 г сухого вещества,  $M$  – биомасса из расчета 1 кал = 4,19 Дж [8, 12].

Полученные результаты обрабатывались методами вариационной статистики с использованием прикладных программ Microsoft Word. Ошибка средней величины для данных надземной массы составляла  $\pm 7-12\%$ .

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Участок № 1, расположенный примерно в 300 м к юго-западу от родника, протянулся в виде ленточной трансекты на высоте 50-70 м по склону крутизной

10-20<sup>0</sup>. Это всхолмленная степь с выходами на поверхность в верхней части участка обломков известняковых пород. Исследования, проведенные в 2002 г., выявили, что на более крутых элементах мезорельефа нагрузка выпаса была достаточно низкой, в результате чего здесь сохранился петрофитный вариант настоящей степи с минимальным почвенным покровом. Выход известняковых пород на поверхность, хорошая инсоляция и прогрев почвы, открытая, хорошо продуваемая местность не создают условия для формирования мощной дернины, она быстро минерализуется. В нижней части участка главенствуют рудеральные виды. Несмотря на высокое флористическое разнообразие и сомкнутость травостоя, на данном участке произошло полное замещение коренного сообщества на производное, обедненное по структуре и сложению. В 2002 г. на участке № 1 выявлена ass. *Salvia pratensis* – *Peganum harmala* – *Elytrigia repens* (пырейно – гармалово – шалфейная ассоциация), которая спустя 10 лет сменилась на ass. *Ephedra distachya* + *Teucrium chamaedrys* – *Festuca rupicola* (типчаково – дубровниково – эфедровую), что свидетельствует об активной перестройке фитоценоза с полной сменой доминантного состава видов. Отсутствие отчуждения травостоя, которое проходило ранее в результате интенсивного выпаса, создало благоприятные условия для вегетативно-подвижных растений с длиннокорневищными, короткокорневищными и корнеотпрысковыми типами корневых систем. Этим объясняется относительно быстрое восстановление сообщества на месте сильно засоренной и угнетенной растительности, особенно в нижней части данной пробной площади.

Участок № 2 был заложен на месте заброшенных огородов воинской части, которая была выведена с этой территории в начале 90-х годов прошлого века, т.е. это полностью вторичный по происхождению участок степной растительности. Растительное сообщество на данной территории находилось на стадии сложной, незамкнутой группировки с переходом от бурьянистой к длиннокорневищной стадии [13]. Здесь выявлена ass. *Agropyron pectinatum* – *Verbascum phoeniceum* – *Falcaria vulgaris* (резаково – коровяково – житняковая ассоциация), которая спустя 10 лет сменилась на ass. *Achillea setacea* – *Bromopsis riparia* – *Galium verum* (подмаренниково – кострецово – тысячелистниковую) с резким снижением общей численности видов за счет выпадения сорных и адвентивных видов.

Участок № 3 расположен на крутом (до 20-25<sup>0</sup>) южном склоне горы Опук на высоте 140-150 м, почвы сильно смыты по профилю с выходами на поверхность плотного известняка, преобладает кальцефильная поликарпическая растительность, которая до учреждения заповедника из-за малой доступности участка не была нарушена. Развитая на этой территории в 2002 г. ass. *Artemisia taurica* – *Stipa capillata* – *Hedysarum candidum* (копеечниково – ковыльно – полынная ассоциация) спустя 10 лет сменилась на ass. *Stipa capillata* – *Artemisia taurica* – *Phlomis pungens* (зопниково – полынно – ковыльную). Вследствие высокой крутизны склона и крайне незначительного слоя образующейся подстилки, которая при высоком уровне инсоляции и устойчивых ветровых потоках быстро минерализуется, мезофитизация на этом участке не наблюдается. Здесь сформировался петрофитный вариант настоящей степи, претерпевший незначительные изменения в сложении в основном

за счет активизации преимущественно клоновой и экотопической мозаики с учетом разнообразия микрорельефа.

Пробный участок № 4 находится на северо-восточном склоне горы Опук с выраженным уклоном 5-10° на высоте 35 м над у. м. На данном участке с 2005 по 2010 гг. периодически происходили пожары. Участок расположен вблизи границы заповедника недалеко от морского побережья, огонь от палов сельскохозяйственных угодий при сильном ветре (в нарушение существующего законодательства, запрещающего подобную деятельность) перебрасывается на заповедную территорию. Запас подстилки здесь крайне незначителен, преобладают длиннокорневищные и корнеотпрысковые растения, быстро восстанавливающиеся после пожара, который обнажает почву и тем самым создает благоприятные условия для внедрения адвентивных растений, поэтому процессы мезофитизации на данном участке не выражены, главенствует ксерофитная растительность, адаптированная к избытку образующихся зольных элементов. На участке сформирована ass. *Festuca rupicola* – *Centaurea salonitana* – *Achillea setacea* (тысячелистниково – васильково – типчаковая ассоциация).

Пробный участок № 5 находится в 500 м от участка № 4, вблизи границы заповедника, на северо-восточном склоне горы Опук с крутизной склона 20-25° на высоте 60 м над у. м. Он также испытывает периодическое пирогенное воздействие, что привело к практически полному разрушению подстилки, выпадению ряда многолетних растений, неустойчивых к пожарам, обилию в составе травостоя однолетников. Здесь выявлена ass. *Achillea setacea* – *Stachys cretica* + [*Inula oculis-christi*] – *Festuca rupicola* (типчаково – девясилково – чистяково – тысячелистниковая ассоциация).

Первичная продукция экосистем является её важнейшей характеристикой, оценкой свободной энергии, которая обеспечивает протекание биологического круговорота [14]. Знание этой величины необходимо как для понимания функционирования фитоценозов, так и для оценки их продукционного потенциала. Эти данные отражают колебания и особенности продукционно-деструкционных процессов в степных фитоценозах с различным режимом существования, а также направленность развития экосистем для данного региона [15]. Количественное изучение слагающих сообщество растений позволяет выявить флуктуации и сукцессии растительного покрова, что важно для фоновых мониторинговых наблюдений в связи с проблемой восстановления растительного покрова заповедника.

Структура и запасы растительного вещества отражают как различия экосистем, так и связи с изменением пространственного размещения на ландшафтном профиле. Большие запасы фитомассы указывают на высокую интенсивность продукционного процесса, накопление мортмассы (опад + подстилка) – на низкую скорость деструкции.

Анализ продукционно-деструкционного процесса на исследуемых участках показал, что распределение растительной биомассы в пространстве было подчинено четкой топологической закономерности: минимальные ее запасы отмечены в экосистемах элювиальной позиции (крутые склоны), а максимальные –

трансаккумулятивной (подножья склонов) с учетом величины предшествующей пахсальной нагрузки.

Количественные соотношения видов и запас фитомассы в растительных сообществах существенно меняется в зависимости от температурного режима и влагообеспеченности [16]. Анализ метеорологических данных по годам исследований выявил значительные различия в погодных условиях (рис. 1). Так, среднегодовые температуры в 2010-2012 гг. существенно не отличались, зимы были теплыми, лишь в феврале 2012 г. средняя температура в зимний период достигала  $-4^{\circ}\text{C}$ .

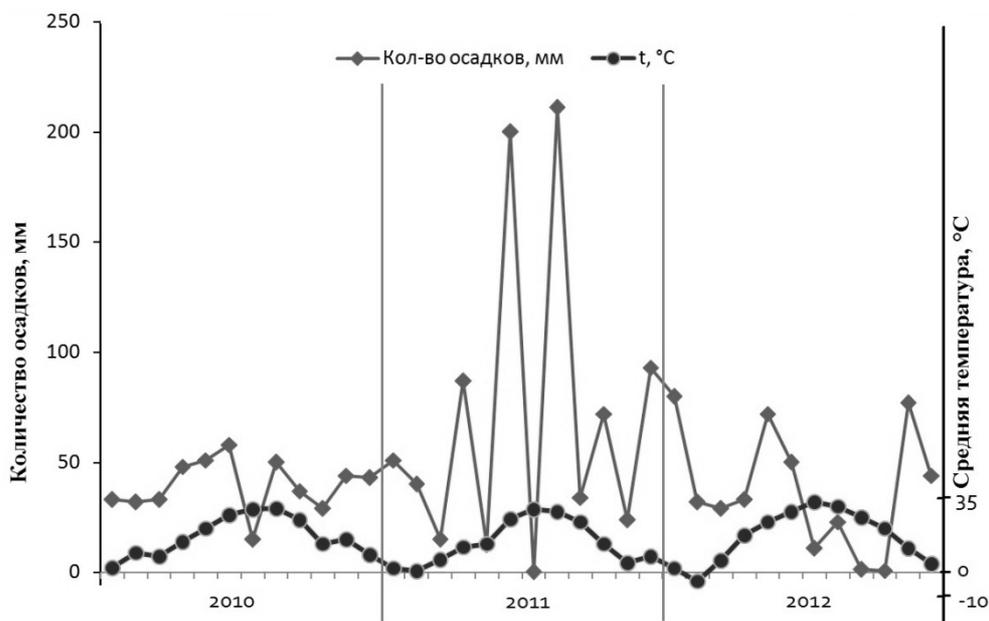


Рис. 1. Изменение гидротермических условий на территории Опукского природного заповедника в 2010-2012 гг.

В весенний период 2012 г. температурные показатели стремительно возросли и в комплексе с большим количеством осадков (более 70 мм) создали благоприятные условия для образования значительного количества фитомассы. Следует отметить, что за 10-летний период прослеживается заметное увеличение среднегодовой температуры воздуха в среднем на  $0,5-0,7^{\circ}\text{C}$  при резком снижении в весенне-летний период количества атмосферных осадков. Особенно засушливыми были 2001, 2002 и 2010 гг. Неблагоприятные гидротермические условия привели к существенному уменьшению запасов почвенной влаги, иссушению верхнего корнеобитаемого горизонта, снижению относительной влажности воздуха в летний период, что негативно повлияло на цикл развития и продуктивность произрастающих здесь растений. Вследствие этого растительный покров трансформировался в сторону усиления его ксерофитизации по крутым склонам овражно-балочного рельефа

заповедника и мезофитизации в связи с накоплением многолетнего степного войлока по днищам балок. Достаточно обильные, но кратковременные осадки в конце мая и июня, а также во второй половине августа препятствовали возникновению пожаров в 2011 и 2012 гг. Напротив, острейший дефицит влаги и высокие температуры в 2010 г. привели к многократным пожарам на участках №№ 4 и 5. Таким образом, запасы формирующейся фитомассы, накопление опада и подстилки четко коррелируют с разногодичной динамикой климатических факторов, ускоряющих или замедляющих накопление растительной биомассы.

Необходимо отметить, что количество первичной продукции каждого конкретного фитоценоза зависит как от метеорологических условий данного года, так и от биологических особенностей видов, слагающих это сообщество. Количественные выражения общей величины растительной массы изучаемых сообществ и соотношения между отдельными её составляющими, а также ход, темп, ритмика образования и разрушения определяются биологическими и морфологическими особенностями компонентов растительного покрова [13]. Масса ежегодно накапливающихся мертвых остатков определяется количеством неразложившихся мертвых остатков прошлых лет, величиной зеленой части надземной массы, отмершей к осени и образующей опад, оставшимися осенью еще на корню зелеными частями растений, отмерших в течение зимы и весны следующего года [6, 17]. Выделяемые в фитомассе укусы биогруппы можно рассматривать в качестве элементарных структурных единиц в общей растительной массе, несущих на себе определенную функциональную нагрузку, а соотношение их и весовые показатели выступают маркерами сезонной динамики продукционно-деструкционных процессов растительного покрова степей заповедника. Показатели продуктивности можно характеризовать и как звенья сукцессионного ряда, каждый из которых представляет ту или иную стадию смены растительного покрова.

Общая продуктивность травостоя в период его максимального развития в 2002 г. была достаточно высокая – от 35,8 до 42,3 ц/га, но в распределении по хозяйственно-ботаническим группам на пробных участках отмечены существенные различия.

На участке № 1 ведущей по запасам (8,3 ц/га) была группа разнотравья, в сложении травостоя бобовые и осоки практически отсутствовали, злаки занимали по весовым показателям 2-е место – 5,8 ц/га (табл. 1). Сорные однолетние виды, большинство которых завершают свое развитие к началу июня, с усилением летней засухи начинают массово отмирать, образуя многолетнюю подстилку. На данном участке суммарная величина продуктивности групп опада и подстилки достигает 63,9 %.

Величина общей биологической продуктивности спустя 10 лет в условиях заповедного режима на участке № 1 возросла почти в 2 раза, составив в 2011 г. 72,9 ц/га, а в 2012 г. – 76,3 ц/га. Особенно значителен прирост объемов многолетнего разнотравья – 28,2–29,7 ц/га, он увеличился почти в 3 раза (табл. 1). Вследствие формирования многолетней подстилки и повышения увлажнения в приземном горизонте более высокая биомасса отмечена у группы осок, хотя её общий объем все еще невелик. Фитомасса достигает 54,3–56,2 % от общей биологической

продуктивности, в 2012 г. ее объем существенно увеличился из-за благоприятного гидротермального режима в конце весеннего периода. На этом участке отмечены самые высокие показатели годовичного опада, т.к. резкое возрастание температуры в начале лета и стабильно высокие температуры в течение всего вегетационного сезона активизировали процесс его формирования.

Таблица 1

**Динамика продуктивности пробных площадей Олукского природного заповедника в период максимального развития травостоя**

Участки	Годы	Продуктивность, ц/га							
		Злаки	Бобовые	Осоки	Разнотравье	Σ фитомасса	Опад	Подстилка	Общая продукт.
№ 1	2002	5,8 ± 0,7	0,3 ± 0,03	0,01 ± 0,002	8,3 ± 0,9	14,4 ± 1,7	11,7 ± 1,4	13,8 ± 2,3	39,9 ± 2,9
	2011	8,2 ± 0,9	0	0,2 ± 0,02	28,2 ± 3,4	36,6 ± 4,1	12,5 ± 1,3	23,8 ± 2,4	72,9 ± 6,5
	2012	11,4 ± 1,2	0	0,4 ± 0,03	29,7 ± 2,7	41,5,5 ± 3,8	20,0 ± 2,2	14,8 ± 1,6	76,3 ± 6,3
№ 2	2002	7,3 ± 0,8	0	0	4,2 ± 0,4	11,5 ± 1,2	12,6 ± 2,5	11,7 ± 1,3	35,8 ± 2,9
	2011	12,4 ± 1,5	0	0	5,4 ± 0,5	17,8 ± 2,1	11,5 ± 1,3	10,1 ± 0,7	39,4 ± 1,9
	2012	17,5 ± 1,7	0	0	12,6 ± 1,1	30,1 ± 3,6	26,8 ± 2,9	20,7 ± 2,3	77,6 ± 8,1
№ 3	2002	4,7 ± 0,4	1,1 ± 0,05	0	5,9 ± 0,5	11,7 ± 1,4	21,0 ± 2,5	9,6 ± 1,2	42,3 ± 3,7
	2011	10,3 ± 0,8	2,2 ± 0,1	0	7,1 ± 0,8	19,6 ± 2,1	12,6 ± 1,2	6,4 ± 0,7	38,6 ± 4,2
	2012	8,0 ± 0,7	2,9 ± 0,2	0	25,6 ± 2,1	36,5 ± 3,2	14,9 ± 1,7	9,1 ± 0,9	60,5 ± 5,4
№ 4	2002	–	–	–	–	–	–	–	–
	2011	6,3 ± 0,6	0,1 ± 0,01	0	9,3 ± 1,1	15,7 ± 1,6	8,7 ± 0,7	11,6 ± 1,2	36,0 ± 3,4
	2012	12,2 ± 1,5	0,2 ± 0,02	0	25,7 ± 2,8	38,1 ± 3,5	21,4 ± 1,8	13,7 ± 1,3	73,2 ± 7,5
№ 5	2002	–	–	–	–	–	–	–	–
	2011	3,3 ± 0,3	0	0	5,6 ± 0,6	8,9 ± 1,1	3,8 ± 0,5	5,3 ± 0,6	18,0 ± 1,9
	2012	9,1 ± 0,8	0	0	5,0 ± 0,5	14,1 ± 1,5	11,2 ± 1,1	8,5 ± 0,9	33,8 ± 3,1

При изучении интенсивности разложения свежесотмершего травостоя отмечено, что листовые пластинки многих видов разнотравья (тысячелистник, лабазник, герань и др.) разлагаются быстро, а побеговая часть злаков минерализуется медленнее. Темпы разложения отмерших органов растений зависят от их зольного состава, в частности, от количества кремния: наиболее медленно разлагаются отмершие листья пырея, типчака и костра, в которых по данным содержит 2–3% кремния (на абс. сухое вещество) против 0,03–0,3% в фитомассе большинства двудольных [19]. Кроме того, у одних видов процесс побегообразования идет скачкообразно, в сжатые сроки (например, у лабазника обыкновенного), а у других – постепенно, т.е. отмирание вегетативных органов у растений протекает с разной скоростью. У однолетников этот процесс более сжат во времени, у злаков интенсивность отмирания надземных побегов определяется режимом влагообеспеченности корнеобитаемого почвенного слоя.

Самая высокая продуктивность многолетняя подстилка – 23,8 ц/га выявлена в 2011 г. Обилие в ней крупных, плохо разложившихся остатков свидетельствует о недостаточном увлажнении в осенне-зимний период 2010 г. (рис.1). Обильные, хотя

и кратковременные дожди в 2011 г. способствовали активизации минерализации подстилки, поэтому ее объем в 2012 г. в 1,6 раза меньше по сравнению с предшествующим годом (табл. 1). Слой ветоши и подстилки перехватывают влагу летних дождей и тем самым уменьшает влагообеспеченность поверхностных горизонтов почвы, поэтому общий расход почвенной влаги здесь ниже. Подстилка обладает большей гигроскопичностью, противодействуя высыханию почвы летом и содействуя более раннему прогреванию её весной, что сглаживает амплитуды колебания температур на поверхности почвы в течение вегетационного периода [8].

На пробном участке № 2 (вторичная степь) с высокой активностью демутиационных процессов интенсивный переход от бурьянистой к длиннокорневищной стадии, представленной преимущественно злаками, выводит именно эту группу в общей величине продуктивности на первое место – 7,3 ц/га, объем биомассы группы разнотравья почти в 1,5 раза меньше (табл. 1). Минимальное количество осадков в зимний период 2001 г. и острейший дефицит влаги в весенне-летний период 2002 г. способствовал активному формированию опада, который оказался ведущей группой в составе показателей продуктивности (12,6 ц/га). Низкие запасы влаги в 2001 г. год и её дефицит в 2002 г. привели к резкому замедлению процессов минерализации подстилки, тем не менее, ее продуктивность была достаточно высокой (11,7 ц/га), поэтому величина быстро минерализующейся мортмассы на данном участке составила в целом 67,9 %.

Разложение подстилки, осуществляемое различными гетеротрофами, обычно совпадает с периодом наибольшего прироста зеленой массы. Это объясняется сходством оптимальных гидроклиматических условий, необходимых для развития растений, синтезирующих живое вещество, и для организмов, его разлагающих. В разных географических условиях эти процессы протекают различно и также подчинены определенной ритмике, тесно связанной с динамикой климатических факторов [18]. Накопление большого количества ветоши и подстилки резко меняет условия существования растений, в первую очередь, отражаясь на условиях увлажнения приземных слоев воздуха и поверхностных горизонтов почвы. Все это влияет на жизнедеятельность растений, слагающих данное сообщество, приводя к выпадению из травостоя одних и разрастанию других видов.

Спустя 10 лет на пробном участке № 2 в связи активными процессами демутиации, ведущая группа в составе фитомассы представлена злаками (12,4–17,5 ц/га), группа разнотравья по весовым показателям почти в 2 раза меньше, не выделяются биогруппы осок и бобовых. В целом, здесь также наблюдается активный прирост фитомассы, особенно в 2012 г. (30,1 ц/га), но преимущественно за счет обилия однолетних и поликарпических видов, активным формированием плотнокустовых дернин типчака и ковылей. Нарастание мощной дернины подавляет прорастание всходов, ценопопуляции многих видов оказываются более однородными по возрастному составу, в котором преобладают взрослые особи. Постепенное формирование сенильных растений и мощной дернины изменяет количественные соотношения надземной массы живого и мертвого вещества. В 2012 г. общая продуктивность данного фитоценоза выросла в среднем в 2 раза по сравнению с 2002 г. (табл. 1).

На пробном участке № 3 продуктивность разнотравья и злаков составляла 4,7 и 5,9 ц/га соответственно, группа осок практически отсутствовала. Вследствие ксерофитных условий обитания группа бобовых, представленных в основном однолетними видами, имела крайне низкую продуктивность (табл. 1). Неблагоприятный водный режим в 2002 г. в период активной вегетации растений привел к образованию огромной массы опада (21 ц/га). Ветровые потоки и крутизна склона на этом участке также препятствовали накоплению многолетней подстилки, запасы которой составили 9,1 ц/га. В ней отсутствовали перезимовавшие листья и стебли бобовых, полностью минерализованные в осенне-зимний период. Переход листьев летне-зимнезеленых видов в опад в течение весны происходит постепенно, именно они и создают основную массу опада. Содержание годичных отмерших побегов составило 49,6 %. В целом, интенсивная инсоляция, дефицит влаги, сильное иссушение почвы создали негативные условия для большинства произрастающих здесь видов. Таким образом, это растительное сообщество еще не перешло в своем развитии к стадии плотнокустовых злаков, продуцирующих мощную многолетнюю дернину.

Сформировавшееся на участке № 3 растительное сообщество, занимающее самое высокое местоположение, отличается наименьшей продуктивностью. Интенсивная инсоляция, быстрая потеря влаги в почве на склоне, приводит к интенсивному разрушению и выветриванию подстилки, поэтому запасы ее крайне незначительны (6,4–9,1 ц/га) (табл. 1). Разнотравье сохраняет ведущую позицию в этом фитоценозе в течение всех лет наблюдений, увеличивается значимость группы бобовых, наиболее высокая продуктивность на этом участке (60,5 ц/га) отмечена в 2012 г.

Участок № 4 – горельник, в 2010 г. он полностью выгорал в августе и сентябре, поэтому в 2011 г. здесь выявлены достаточно низкие объемы разнотравья и злаков, их суммарная фитомасса составила всего 15,7 ц/га вследствие разрушения гумуса и накопление зольных элементов. Пирогенный фактор приводит к смене ассоциаций и усиливает дигрессию растительности. В 2011 и 2012 гг. пожаров на этой территории не было, вследствие чего в осенне-зимний период произошло активное накопление минерализация опада. Благодаря гигроскопичности подстилки, запасы которой возросли (11,6–13,7 ц/га), повышается влагообеспеченность поверхностных горизонтов почвы, активно прорастают семена малоконкурентных видов, после пожара на обнаженной почве появляется большое количество всходов сорняков, поэтому флористический состав даже в течение последних двух лет сильно изменился по составу. Более устойчивыми к негативным факторам окружающей среды являются длиннокорневищные и дерновинные злаки, они дольше сохраняют способность к возобновлению. По данным А.М. Семеновой-Тянь-Шанской (1977), после пожаров отмирает до 40 % дернин типчака и 20 % ковыля [8]. Эдификаторной синузией становится группа корневищных видов, из травостоя исчезают эфемероиды. Изучение жизненных форм, слагающих пирогенные фитоценозы, выявило, что в первую очередь погибают гемикриптофиты, почки возобновления которых находятся на поверхности почвы и слабо защищены от огня. Например, у полыней сгорают все надземные органы, повреждаются почки

возобновления, поэтому данные растения быстро погибают и выпадают из травостоя. Напротив, типчак и ковыли через год достаточно активно восстанавливают свои позиции, поскольку их почки возобновления находятся вблизи поверхности почвы, и их рост интеркалярный. В 2012 г. общая продуктивность на участке № 4 удвоилась (73,2 ц/га) по сравнению с предшествующим годом.

Участок № 5 расположен на крутом склоне, дождь и ветровые потоки быстро рассеивают как опад, так и подстилку, поэтому запасы их минимальны, а при устойчивом огневом воздействии мортмасса полностью выгорает и не защищает почву от промерзания в зимний период. В 2011 г. общая биологическая продуктивность этого фитоценоза была самой низкой (18 ц/га), но при отсутствии пожаров в течение 2-х последних лет её объем возрос почти в 2 раза (табл. 1). Продуктивность группы разнотравья за годы исследований практически не изменилась (5,0-5,6 ц/га), зато величина этого показателя у группы злаков увеличилась в среднем в 3 раза в основном за счет однолетников и активного разрастания дернин типчака и ковыля. Величина годовой продукции в целом зависит от режима увлажнения первой половины вегетационного периода. Климатические характеристики весны 2012 г. по количеству осадков и величине температур способствовали активному росту фитомассы.

Пожары ведут отбор и по возрастному спектру ценопопуляций многих видов, которые становятся более однородными, в составе их преобладают ювенильные и виргинильные виды.

При установлении заповедного режима и снятии антропогенной нагрузки наблюдается увеличение доли крупнодерновинных злаков (ковылей) и снижение доли мелкодерновинных (типчака), накапливается, в основном за счет мортмассы, надземная биомасса, наблюдается быстрый рост запасов ветоши, а в последующие годы и подстилки. Они предохраняют почвы от промерзания и создают более благоприятные условия для внедрения в травостой семян мезофитных и нехолодостойких видов.

Отношение мортмассы к фитомассе и мортмассы к общей продуктивности в 2002 г. на участке № 1 свидетельствует о значительном превышении величины фитомассы над отмершей массой и быстрой деструкции образующейся ветоши (табл. 2). На участке № 2 на бурьянистой стадии развития фитоценоза фитомасса также существенно превышала объем накапливаемой мортмассы, процессы разложения которой происходят достаточно интенсивно в течение 7-9 месяцев. На участке № 3 объемы фитомассы и мортмассы сбалансированы, но процессы разложения и формирования подстилки крайне замедляются из-за дефицита влаги.

Анализ соотношения этих же показателей в 2011 г. свидетельствует о том, что на участке № 1 начался процесс накопления многолетней подстилки, но из-за климатических факторов он растягивается во времени на 1-1,5 года. На участке № 2 наблюдается ускорение процессов минерализации подстилки, которая разлагается за 9-11 месяцев [20]. На участках №№ 3, 4 и 5 выявлен баланс между фитомассой и отмершей ветошью и подстилкой и удлинение процессов деструкции растительных остатков.

**Таблица 2**

**Соотношение мортмассы фитомассы и общей продуктивности на пробных площадях Опускского природного заповедника**

Участки	Отношение мортмассы к фитомассе			Отношение мортмассы к общей продуктивности		
	2002 г.	2011 г.	2012 г.	2002 г.	2011 г.	2012 г.
№ 1	1 : 1,7	1 : 1,0	1 : 0,7	1 : 0,6	1 : 0,5	1 : 0,4
№ 2	1 : 2,1	1 : 1,2	1 : 1,4	1 : 0,7	1 : 0,7	1 : 0,6
№ 3	1 : 1,0	1 : 1,0	1 : 0,8	1 : 0,5	1 : 0,5	1 : 0,5
№ 4	–	1 : 1,0	1 : 0,9	–	1 : 0,5	1 : 0,6
№ 5	–	1 : 1,0	1 : 1,6	–	1 : 0,5	1 : 0,5

В 2012 г. благодаря благоприятным условиям зимне-весеннего периода и высоким температурным показателям вегетационного сезона при дефиците влаги, особенно во второй половине лета процессы распада подстилки резко замедляются. Активный прирост фитомассы на участках №№ 2 и 5 происходит в основном за счет интенсивного развития злаков и ковылей.

В степных сообществах преобладает однолетний цикл минерализации опада, но вследствие особенностей климата этого региона в отдельные годы данный процесс растягивается на более длительный период. Следовательно, эффективность функционирования степных фитоценозов ОПЗ обеспечивается за счет высокой скорости нарастания биомассы, её отмирания и накопления, т.е. активной трансформации энергии.

Актуальность анализа энергетического потенциала пробных площадей ОПЗ на основе величины показателей подстилки и опада заключается в том, что материалы о накоплении и динамике энергии в степных фитоценозах Керченского полуострова отсутствуют.

Следует заметить, что разграничить опад и подстилку даже в степи бывает очень трудно ввиду отсутствия достаточно ясных критериев для их разделения. Подстилка складывается в основном из отмерших растений и их остатков, находящихся на разных стадиях разложения. Накопление на поверхности почвы отмерших растительных остатков обусловлено ритмикой развития травянистых растений, у которых при наступлении неблагоприятных погодных условий наблюдается понижение жизнедеятельности, характеризующееся отмиранием ассимилирующих органов. Заметное накопление ветоши проявляется к июню за счет отмирания перезимовавших прошлогодних листьев и листьев первой генерации текущего года.

В ходе исследований было установлено, что на пробных площадях ОПЗ запасы подстилки варьировали в пределах 12,3 – 60,0 г/м<sup>2</sup> (табл. 3). Наименьший показатель отмечен на участке № 3, максимальный – на участке № 2 (вторичная степь).

Были проведены расчеты энергетического потенциала подстилки по степным участкам за 2011-2012 гг. Энергетический потенциал подстилки в 2011 г. был на уровне 0,14×10<sup>6</sup> – 0,65×10<sup>6</sup> Дж/м<sup>2</sup>, в 2012 г. – 0,23×10<sup>6</sup> – 0,65×10<sup>6</sup> Дж/м<sup>2</sup>, т.е.

заповедный режим создает благоприятные условия для аккумуляции энергии в фитомассе, переходе её в мортмассу, что повышает энергетическую емкость почв.

Таблица 3

Динамика накопления подстилки на пробных площадях ОПЗ

Участок Годы	Биомасса подстилки, г/м <sup>2</sup>	
	2011 г.	2012 г.
№ 1	59,4	37,1
№ 2	24,4	60,0
№ 3	12,3	31,1
№ 4	27,9	33,1
№ 5	16,0	21,5

Минимальные значения аккумулированной в подстилке энергии зафиксированы на участке № 3 в 2011 г., т.к. образовавшийся однолетний опад быстро разрушался, что препятствовало накоплению многолетней дернины на склоне (рис. 2). Наибольший энергетический потенциал отмечен на участке № 1 ( $0,65 \times 10^6$  Дж/м<sup>2</sup>) в 2011 г. и участке № 2 ( $0,65 \times 10^6$  Дж/м<sup>2</sup>) в 2012 г. Пределы колебаний энергетического потенциала на всех пробных площадях, кроме участка № 1, достаточно существенны (рис. 2), что, возможно, обусловлено активностью демутационных процессов после снятия интенсивной пастбищной нагрузки при введении заповедного режима, но в 2012 г. на всех пробных участках четко прослеживается общая тенденция возрастания накопленной энергии.

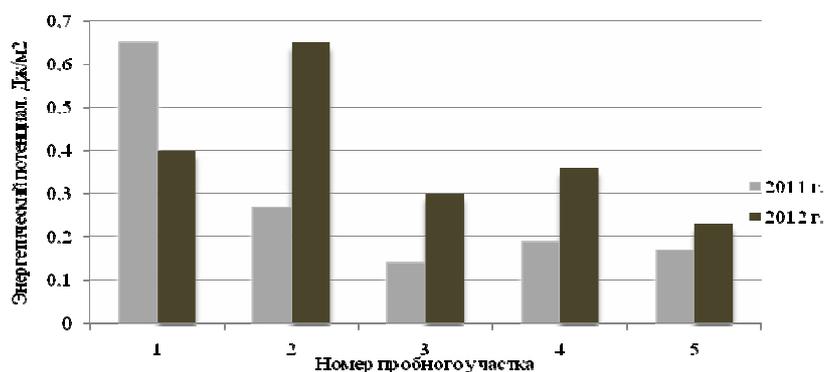


Рис. 2. Энергетический потенциал подстилки пробных площадей ОПЗ

Основной энергетический потенциал в степных экосистемах накапливается в подземном блоке (почвы и подземная часть растений), поэтому надземный блок функционирует в режиме высокой активности фиксации энергии, образования биомассы, её последующего отмирания, накопления мортмассы и перехода в гумус почвы. Аккумуляции энергии в биомассе противодействуют внешние факторы, как климатические (дефицит влаги, периоды засух и низкие зимние температуры), так и организмы–консументы, а также различные виды хозяйственной

деятельности. Введение заповедного режима устраняет влияние антропогенного фактора, в результате устанавливается динамическое равновесие, что стабилизирует экосистемы и повышает эффективность их функционирования.

Я. П. Дидух (2007) оценивает энергетический потенциал фитомассы степных агросистем Крымского полуострова величиной  $0,94 \times 10^6$  Дж/м<sup>2</sup> [21], на заливных лугах лесостепи Украины энергетический потенциал подстилки значительно выше и колеблется от  $0,8 \times 10^6$  до  $16,2 \times 10^6$  Дж/м<sup>2</sup> [22]. Сравнив полученные за годы исследований результаты ( $0,14 \times 10^6$ - $0,65 \times 10^6$  Дж/м<sup>2</sup> в 2011 г.,  $0,23 \times 10^6$  –  $0,65 \times 10^6$  Дж/м<sup>2</sup> в 2012 г.) можно сделать заключение о том, что на территории ОПЗ процесс аккумуляции энергии в почвах при разложении подстилки вследствие особенностей климатического режима протекает значительно медленнее, чем в других регионах.

Поскольку энергетические запасы подстилки тесно коррелируют с весовыми объемами фитомассы, этот показатель можно использовать и для анализа динамики продуктивности природных фитоценозов.

Таким образом, выявленные изменения структуры и продуктивности степных фитоценозов ОПЗ за 10-летний период позволяют прогнозировать происходящие в них процессы и могут служить основой для многолетних мониторинговых исследований.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Изучение закономерностей формирования первичной продуктивности степных фитоценозов Опукского природного заповедника показало, что её количественный и качественный объем, состав и структура находятся в непосредственной зависимости как от метеорологических, орографических и почвенных условий, так и от интенсивности их хозяйственного использования.
2. Одним из главных направлений смен растительности является нивелирование структуры степных травостоев различного исходного состояния под воздействием негативных факторов: пожаров, предшествующего нерегулируемого выпаса, пастбищной дигрессии, осуществляющихся на фоне общей ксерофитизации условий обитания по склонам балок и усиления мезофитизации в понижениях рельефа, вследствие чего возрастает комплексность и мозаичность растительного покрова.
3. Общая продуктивность травостоя в период его максимального развития в 2002 г. колебалась от 35,8 до 42,3 ц/га. На участках №№ 1 и 2 ведущими по биомассе были группы разнотравья и злаков. Вследствие ксерофитных условий обитания биогруппа осок отсутствовала, крайне невысокие значения продуктивности отмечены у группы бобовых, представленных в основном однолетними видами.
4. Значительная фитомасса опада (21 ц/га) обусловлена крайне неблагоприятными условиями водного режима в период активной вегетации растений. Общая биологическая продуктивность в 2011-2012 гг. при установлении заповедного режима на всех пробных участках возросла в 1,5-2 раза.
5. Пирогенный фактор приводит к смене растительных ассоциаций и усиливает дигрессию растительности, на данной территории существенно изменяется флористический состав. На участках, подвергавшихся огневому воздействию в

предшествующие годы (2005-2010 гг.), значения общей биологической продуктивности были минимальными (18-36 ц/га).

6. Анализ соотношений мортмассы к фитомассе и мортмассы к общей биологической продуктивности свидетельствует о том, что на пробных участках начался процесс накопления многолетней подстилки, но из-за климатических особенностей этого региона данный процесс растягивается на длительный период.
7. Заповедный режим создает благоприятные условия для аккумуляции энергии в фитомассе, переходе её в мортмассу, что повышает энергетическую емкость почв Опуцкого природного заповедника. Поскольку энергетические запасы подстилки тесно коррелируют с весовыми объемами фитомассы, энергетический потенциал подстилки можно использовать для анализа динамики продуктивности природных фитоценозов.

#### Список литературы

1. Корженевский В.В. Инвентаризация флоры Опуцкого природного заповедника / В.В. Корженевский, С.Е. Садогурский, Т.В. Белич [и др.] // Материалы II научной конференции «Заповедники Крыма. Биоразнообразие на приоритетных территориях : 5 лет после Гурзуфа» (25-26 апреля 2002 г. – Симферополь : Доля, 2002. – С. 115-118.
2. Корженевский В. В. Анализ флоры высших сосудистых растений Опуцкого природного заповедника / В.В.Корженевский, Л.Э Рыфф // Биоразнообразие природных заповедников Керченского полуострова. Сб. науч. трудов. Никит. бот. сада. – 2006. – Т. 126. – С. 51-73.
3. Кобечинская В. Г. Экологические особенности изменения растительного покрова Опуцкого природного заповедника // В.Г. Кобечинская, И.П. Отурина, В.Л. Апостолов, В.Б. Пышкин // Фальцфейновские чтения. Сб. науч. трудов. – Херсон : ХДУ, 2003. – С. 149-152.
4. Котова И.Н. Флора и растительность Керченского полуострова / И. Н. Котова // Тр. Никит. бот. сада. – 1961. – Т. 35. – С. 64-168.
5. Исиков В.П. Опуцкий природный заповедник / В.П. Исиков // Тр. Никит бот. сада. – 2001. – Т. 120. – С. 13-27.
6. Семенова-Тян-Шанская А.М. Накопление и роль подстилки в травяных сообществах / А. М. Семенова-Тян-Шанская. – Л. : Наука, 1977. – 191 с.
7. Царик И.В. Накопление и разложение подстилки в биогеоценозах субальпийского пояса Карпат / И. В. Царик // Автореф. дисс. канд. биол. наук. – Днепрпетровск, 1977. – 29 с.
8. Дідух Я.П. Еколого-енергетичні аспекти у співвідношенні лісових і степових екосистем / Я.П. Дідух // Укр. ботан журн. – 2005. – Т. 62, № 4. – С. 455-467.
9. Злобин Ю.А. Принципы и методы изучения ценологических популяций растений / Ю. А. Злобин. – Казань : Изд. Казанского гос. ун-та, 1989. – 143 с.
10. Миркин Б.М. Современная наука о растительности / Б. М. Миркин, Л. Г. Наумова, А. И. Соломещ. – М. : Логос, 2002. – С. 114-144.
11. Титлянова А.А. Изучение биологического круговорота в биогеоценозах. Метод. рук-во / А. А. Титлянова. – Новосибирск : Наука, 1971. – 136 с.
12. Одум Г. Энергетический базис человека и природы / Г. Одум, Э. Одум. – М. : Прогресс, 1978. – 379 с.
13. Работнов Т. А. Луговедение / Т.А. Работнов. – М. : МГУ, 1984. – С. 326-347.
14. Титлянова А.А. Биологическая продуктивность травяных экосистем. Географические закономерности и экологические особенности / А.А. Титлянова, Н.И. Базилевич, В. А. Снытко. – Новосибирск : Наука, 1988. – 134 с.
15. Кобечинская В.Г. Сравнительная характеристика структуры и продуктивность степных фитоценозов Карадагского ландшафтно-экологического стационара и горного массива Эчки-даг / В.Г. Кобечинская // Сб. науч. трудов, посвященных 95-летию Карадагской научной станции и 30-летию Карадагского природного заповедника Национальной академии наук Украины / Под ред. А.В. Гаевской, А.Л. Морозова. – Севастополь : ЭКОСИ-гидрофизика, 2009. – С. 125-136.

16. Ведь И.П. Мезо- и микроклиматическое разнообразие Крыма / И.П. Ведь // Вопросы развития Крыма. – Симферополь : Сонат, 1999. – Вып. 11. – С. 10-12.
17. Ткаченко В.С. Фітоценотичний моніторинг резерватних сукцесій в Українському степовому природному заповіднику / В.С. Ткаченко. – К. : Фітосоціоцентр, 2004. – 183 с.
18. Якуба М.С. Особенности процессов формирования и трансформации подстилки в биогеоценозах Присамарья Днепропетровского / М.С. Якуба // Вісник Дніпропетр. ун-ту. Сер біологія. Екологія. – 2002. – Т. 1, вип. 10. – С. 66-71.
19. Быстрицкая Т.Л. Почвы и первичная биологическая продуктивность степей Приазовья / Т. Л. Быстрицкая, В. В. Осычнюк. – М. : Наука, 1975. – 110 с.
20. Базилевич Н.И. Биологическая продуктивность экосистем Северной Евразии / Н. И. Базилевич. – М. : Наука, 1993. – С. 34-89.
21. Дідух Я.П. Порівняльна оцінка енергетичних запасів екосистем України / Я.П. Дідух // Укр. ботан. журн. – 2007. – Т. 64, № 2. – С. 177-194.
22. Орлова Л.Д. Запаси підстилки на заплачних луках лівобережного лісостепу України / Л.Д. Орлова // Укр. ботан. журн. – 2012. – Т. 69, № 5. – С. 652-661.

## THE DYNAMICS OF PRIMARY BIOLOGICAL PRODUCTIVITY OF STEPPE PHYTOCENOSES IN OPUKSKY NATURAL RESERVE

*Kobechinskaya V.G., Oturina I.P., Kotolup M.V.*

*Taurida National V.I. Vernadsky University, Simferopol, Crimea Republic, Russia  
E-mail: valecHOME@mail.ru*

The natural-anthropogenic dynamics of production process in the steppe phytocenoses of the Opuksky Nature Reserve for a 10-year period (2002-2012) was analyzed. After many years of observing the indicators of changes in the composition, structure and productivity of plant communities on the five pilot sites some trends in the transformation of vegetation were identified. A comparison was made to show the impact of a pascual digression, fires, demutational processes that cause changes in plant communities with the establishment of the protected mode.

The study of regularities in the formation of primary productivity of steppe phytocenoses in Opuksky Nature Reserve showed that its qualitative and quantitative volume, composition and structure are directly dependent on meteorological, orographic and soil conditions, as well as on the intensity of their economic use.

Gross productivity of the herbage during its maximum development in 2002 ranged from 35,8 to 42,3 kg/ha. On the trial sites forbs and grasses were leading among the other plant's groups in biomass. The very poor conditions of water regime during the active growing period stipulate the significant mass of litter (21 q/ha). Gross biological productivity in 2011-2012 during the protected mode on all test sites increased by 1,5-2 times.

Pyrogenic factor leads to a change in plant associations and enhances the vegetation digression; in Opuksky Nature Reserve floristic composition varies considerably. In areas exposed to fires in previous years (2005-2010), the volume of the gross biological productivity was minimal (18-36 hwt/ha).

Analysis of ratios of mortmass to phytomass and mortmass to the gross biological productivity suggests that a process of accumulation of the long-term litter began on the trial sites, but because of the special climatic characteristics of the region in some years, this process extends over a long period.

Reserve mode creates favorable conditions for the accumulation of energy in the phytomass, its transition to mortmass, thereby the energy capacitance of Opuksky Nature Reserve's soils increases. Since energy reserves of the litter are closely correlated with weight volumes of biomass, the energy potential of litter can be used to analyze the dynamics and productivity of natural phytocenoses.

The identified changes in the structure and productivity of steppe phytocenoses of Opuksky Nature Reserve for 10-year period allow to predict the processes occurring in them and can serve as a basis for long-term monitoring investigations.

**Keywords:** biological productivity, steppe plant communities, Opuksky Nature Reserve, the dynamics of phytomass, the energy potential of the litter.

### References

1. Korzhenevsky V.V., Sadogurskiy S.E., Belich T.V. Inventory of flora Opuksky Nature Reserve. II Science Conf. «Reserves of the Crimea. Biodiversity in priority areas: 5 years after Gurzuf», 115-118. (2002).
2. Korzhenevsky V. V., Ryff L. E. Analysis of the flora of vascular plants of Opuk Natural Reserve. Biodiversity of the natural reserves of the Kerch Peninsula, *Proc. Nikita Bot. Garden*, **126**, 51-73 (2006).
3. Kobechinskaya V. G., Oturina I. P., Apostolov V. L., Pishkin V. B. Ecotopic particular of vegetation's changes of Opuk Nature Reserve, Faltsfeynovsky reading, 149-152 (2003).
4. Kotova I. N. The flora and vegetation of the Kerch Peninsula, *Proc. Nikita Bot. Garden*, **35**, 64-168, (1961).
5. Isikov V. P. Opuk Nature Reserve, *Proc. Nikita Bot. Garden*, **120**, 13-27 (2001).
6. Semenova-Tyan-Shanskaya A. M. Accumulation and role of litter in plant communities, 191 p. (Nauka, 1977).
7. Carik I. V. Accumulation and decomposition of litter in the subalpine zone of the Carpathians biogeocenoses, 29 p. (1977).
8. Diduh Ya. P. Environmental and energy aspects in the ratio of forest and grassland ecosystems, *Ukr. Bot. Journal*, **62**, 4, 455-467 (2005).
9. Zlobin Yu. A. Principles and methods of the study of coenotic plant populations, 143 p. (Kazan State University, 1989) c.
10. Mirkin B. M., Naumov L. G., Solomeshch A. I. The modern science of vegetation, 114-144 (Logos, 2002).
11. Titlyanova A. A. The study of the biological cycle in biogeocenoses 136 p. (Nauka, 1971).
12. Odum G., Odum E. Energy basis of man and nature, 379 p. (Progress, 1978).
13. Rabotnov T. A. Science of meadows, 326-347 (MGU, 1984).
14. Titlyanova A. A., Bazilevich L. A., Snytko V. A. Biological productivity of grassland ecosystems. Geographical patterns and ecological features, 134 p. (Nauka, 1988).
15. Kobechinskaya V. G. Comparative characteristics of the structure and productivity of steppe phytocenoses of Karadag scientific station and Echki-Dag massif, 125-136 EKOSY- hydrophysics, 2009).
16. Ved I. P. Mezo- and microclimatic diversity of Crimea, *Issues of development of the Crimea*, **11**, 10-12 (1999).
17. Tkachenko V. S. Phytocoenotic monitoring reservate succession of Ukrainian steppe nature reserve, 183 p. (Phytosococenter, 2004).
18. Yacuba M. S. Features of the processes of formation and transformation litter in biogeocenoses of Dnieper Prissamara, *Herald Dnepropetrovsk university. Series biology Ecology*, **1**, 10, 66-71 (2002).
19. Bystritskaya T. L., Osychnyuk V. V. Soils and primary biological productivity of the Priazov steppes 110 p. (Nauka, 1975).
20. Bazilevich N. I. Biological productivity of ecosystems in North Eurasia, 34-89 (Nauka, 1993).
21. Diduh Ya.P. Comparative assessment of energy resources of Ukraine, *Ukr. Bot. Journal*, **64**, 2, 177-194 (2007).
22. Orlova L. D. The litter's stocks on the floodplain meadows of the left bank steppe Ukraine, *Ukr. Bot. Journal*, **69**, 5, 652-661 (2012)/

Поступила в редакцию 22.09.2014 г.

**УДК 61.616-006**

## **МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ АНЕМИИ У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ**

*Кузьменко Е.В.*

*Государственное Учреждение «Институт медицинской радиологии им. С.П. Григорьева  
НАМН Украины», Харьков, Украина  
E-mail: kuzmenko@meta.ua*

Изложено современное состояние проблемы развития анемии хронического заболевания у онкологических больных. Обсуждаются механизмы и роль провосполительных цитокинов в развитии анемий. Рассматриваются различные подходы к диагностике анемии хронического заболевания у онкологических больных.

**Ключевые слова:** анемия, цитокины, онкология.

Созданный в 2000 году в США Национальный комитет действия по анемии (НААС) определяет ее, как проблему здравоохранения, которая требует всеобщего внимания и действий [1, 2]. По данным ВОЗ, до 20 % населения Земли страдают развитием различных форм анемий [3]. Анемии, сопровождающие опухолевые заболевания, получили название «анемии хронического заболевания» (АХЗ). Данная патология, по мнению ряда авторов [4, 5] особенно широко распространена среди пациентов с гематологическими злокачественными заболеваниями, такими как множественная миелома и лимфома. У пациентов с солидными опухолями самая высокая частота встречаемости анемий наблюдалась у таковых с раком лёгких и раком женских репродуктивных органов, и с опухолями желудочно-кишечного тракта [3]. Приблизительно у 40 % больных отмечают анемию при установлении диагноза. Частота АХЗ возрастает при проведении лучевой терапии, а у пациентов, получающих химиотерапевтическое лечение, этот показатель достигает 90% [6]. Значительное увеличение доз в большинстве случаев невозможно из-за развития побочных реакций, обусловленных повреждением нормальных органов и тканей. Близкая сопряженность лечебного и токсического эффектов является особенностью терапии злокачественных опухолей. Наиболее частыми и выраженными в структуре осложнений терапии злокачественных опухолей являются проявления гематологической токсичности, в частности развитие анемии хронического заболевания. АХЗ тяжелой степени увеличивает склонность больных к инфекциям, которые могут привести к летальному исходу у потенциально излечимого больного, нарушает ритмичность введения цитостатиков и тем самым снижает эффективность противоопухолевой терапии и качество жизни больных. Поиск возможностей прогнозирования, а также профилактики АХЗ при противоопухолевой терапии злокачественных опухолей является актуальным, но недостаточно изученным

вопросом онкологии. Большое количество научных работ и клинических исследований посвящено противоопухолевой терапии онкологических больных, где доказана зависимость эффективности лучевой и полиохиомотерапии (ПХТ) от концентрации гемоглобина, значительное количество осложнений в послеоперационном периоде при выраженной анемии. Доказана связь снижения эффективности терапии и продолжительности жизни онкологических больных в зависимости от тяжести анемического синдрома. Выявлено прямое влияние концентрации гемоглобина на параметры качества жизни пациентов. Анемия является важной причиной связанной с раком слабости, существенно ухудшающей качество жизни пациентов. Утомляемость у онкологических больных развивается чаще у пациентов с анемией нежели у пациентов без анемии. Выявлены достоверные корреляционные связи уровня гемоглобина с показателями качества жизни, утомляемостью, с физическим функционированием. Кроме того, у больных с анемией отмечают снижение эффективности противоопухолевого лечения, связанное, возможно, с развитием радио- и химиорезистентности.

До настоящего времени не определены параметры, характеризующие анемии и рекомендации по коррекции анемического синдрома в данной группе, с учетом возможных особенностей влияния онкологического процесса и лечебных мероприятий на развитие анемии.

Согласно современным представлениям, в основе АХЗ лежит иммуноопосредованный механизм: цитокины и клетки ретикулоэндотелиальной системы (РЭС) вызывают изменения в гомеостазе железа, пролиферации эритроидных предшественников, продукции эритропоэтина и продолжительности жизни эритроцитов. АХЗ является общим гематологическим осложнением у онкологических больных. Частота встречаемости анемий при проведении химиотерапевтического лечения зависит от применяемого препарата.

Анемия 1 – 2 стадий наиболее часто развивалась при лечении: доцетакселом – при немелкоклеточном раке легкого; политакселом, винорелбином, политоксел в сочетании с доксорубицином – при раке грудной железы.

Анемия 3 – 4 стадий наиболее часто развивалась при лечении: топотакселом, цисплатиной в сочетании с этопозидом, политоксел в сочетании с карбоплатиной, при использовании стандартных протоколов химиотерапии: схема VIP (этопозид, ифосфамид, цисплатин) – при мелкоклеточном раке легкого [4].

По данным Kosmidis P. и соавторов [5], у пациентов с локально распространённым ректальным раком при уровне гемоглобина ниже 90 г/л ответ опухоли на предоперативную химиорадиотерапию был хуже по сравнению с наблюдаемым у больных с уровнем гемоглобина, равным или большим 90 г/л. По данным ряда исследователей, появление анемии после адьювантной химиотерапии повышает относительный риск развития локального рецидива в 3 раза по сравнению с пациентами без анемии [6-7].

Анемию рассматривают также как неблагоприятный прогностический фактор исхода заболевания. Она связана с сокращением времени выживания пациентов с карциномой лёгких, цервикальной карциномой, карциномой головы и шеи, раком грудной железы, колоректальным раком, гепатоцеллюлярной карциномой,

карциномой простаты, лимфомой, множественной миеломой, назофарингеальной и эзофагиальной карциномой.

Развитие анемии у онкологических больных обусловлено рядом факторов. Острое или хроническое кровотечение, инфильтрация костного мозга опухолевыми клетками или фиброз как следствие воспалительных реакций, снижение продукции эритропоэтина, связанное с нарушением почечной функции, развитие дефицита пищевых веществ (фолатов, витамина В12 или железа), развитие миелосупрессии, вызванное радиотерапией и/или цитотоксическими агентами, гемолитическая анемия [8].

АХЗ возникает в результате активации иммунной системы опухолевым процессом и/или проводимым противоопухолевым лечением, сопровождаемым избыточным освобождением провоспалительных цитокинов и других медиаторов воспаления. Провоспалительные цитокины ответственны за:

- нарушение продукции эритропоэтина (ЭПО),
- нарушение пролиферации и дифференцировки эритроидных клеток-предшественников,
- снижение выживаемости эритроцитов,
- нарушение метаболизма и утилизации железа,
- неадекватный ответ эритроидных предшественников на ЭПО [9, 10].

В экспериментах *in vitro* и *in vivo* продемонстрирован дозо-зависимый ингибиторный эффект ИФ- $\gamma$ , ИЛ-1 и ФНО- $\alpha$  на продукцию эритропоэтина [11, 12]. Установлена иерархия эффектов различных цитокинов. Наибольшим супрессорным эффектом обладает ИЛ-1 $\beta$ , по сравнению с ИЛ-1 $\alpha$  и ФНО- $\alpha$ .

По данным Саго J.J. и соавторов [13] индуцированное цитокинами ингибирование продукции эритропоэтина опосредовано индукцией транскрипционных факторов GATA-2 и NF- $\kappa$ B (ядерный фактор «каппа-би»).

Ингибиторный эффект цитокинов может быть опосредован птеридинами, продуцируемыми моноцитами и макрофагами при активации ИФ- $\gamma$ , и другими провоспалительными цитокинами. Установлено, что высокие концентрации птеридинов в почечной ткани приводят к значительному снижению синтеза эритропоэтина [14].

Кроме подавления продукции эритропоэтина, провоспалительные цитокины оказывают непосредственное влияние на клеточное дифференцирование по эритроидному пути. Супрессорное действие на эритропоэз оказывают ИФ- $\gamma$ , ИЛ-6, ИЛ-1, ФНО. Полагают, что основную роль в подавлении эритропоэза играет ФНО, механизмы которого интенсивно изучаются в последнее время.

Анемия может быть следствием прямого супрессорного влияния ФНО- $\alpha$ , реализуемого на ранних стадиях эритропоэза.

Исследования Birk D. [15] с использованием клеток K562 и HeLa показали, что GATA-1 является ключевой целью в достижении ингибирующего эффекта ФНО- $\alpha$ . Цитокин индуцировал снижение экспрессии FOG-1, важного кофактора GATA-1, а также вызывал снижение GATA-1 в результате протеасомной деградации. Этими же авторами в ЭПО-зависимой линии клеток TF-1 обнаружено опосредованное ФНО- $\alpha$  ингибирование эритроид-специфических генов: рецептора ЭПО,  $\alpha$ - и  $\gamma$ -

глобина, эритроид-ассоциированного фактора, гидроксиметилбилан синтетазы и гликофорина А [16]. Это снижение сопровождалось уменьшением образования комплекса GATA-1/FOG-1 значительным и быстрым увеличением фосфорилирования MAP-киназы p38. Подавление активности p38 противодействовало ингибиторному эффекту ФНО- $\alpha$  на GATA-1 и на экспрессию  $\gamma$ -глобина в ЭПО-индуцированных TF-1 клетках.

Важным событием, приводящим к нарушению эритропоэза, является снижение числа активных эритроидных предшественников вследствие усиленного апоптоза. Полагают, что индуцированное ФНО- $\alpha$  подавление GATA-1 может, помимо дифференцировки, влиять на запрограммированную клеточную смерть эритробластов, запуская ранний апоптоз через снижение экспрессии антиапоптотического гена bcl-XL, транскрипция которого регулируется GATA-1 [17].

Приводятся сведения об участии ИФ- $\gamma$  и ИЛ-6 в нарушении синтеза гемоглобина. ИФ- $\gamma$  и ИЛ-6, активируют фосфорилирование транскрипционного фактора STAT3, что приводит к подавлению экспрессии гена  $\gamma$ -глобина в первичных эритроидных клетках [23-25] и снижению продукции эмбрионального гемоглобина в K562 клетках. В экспериментах эффект STAT3 нивелировался индуцированной сверхэкспрессией GATA-1 [18, 19].

Провоспалительные цитокины участвуют в активации эритрофагоцитоза. При воспалительных процессах цитокины стимулируют иммунные клетки, индуцируя освобождение свободных радикалов, оказывающих повреждающее действие на эритроцитарные мембраны. Наряду с этим цитокины активируют макрофаги, индуцируя фагоцитоз повреждённых, более чувствительных к фагоцитозу эритроцитов. Наиболее важную роль в этом процессе, как полагают, играет ФНО- $\alpha$ . У больных с анемией хронического заболевания (АХЗ), имевших более высокие концентрации провоспалительных цитокинов, выживаемость эритроцитов была ниже по сравнению с регистрируемой у пациентов без анемии [20]. Одним из ключевых факторов в патогенезе АХЗ является вызванное цитокинами нарушение метаболизма железа.

Провоспалительные цитокины оказывают влияние на метаболизм железа посредством различных механизмов. ИФ- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1, ИЛ-6 стимулируют синтез ферритина, (основного белка, отражающего запасы железа.) Цитокины индуцируют повышение экспрессии транспортёра двухвалентного железа ДМТ-1, переносящего железо через клеточную мембрану, и снижение экспрессии ферропортина, единственного известного экспортёра железа [21]. Это приводит к задержке железа в моноцитах/макрофагах, накапливающих избыточное железо в виде ферритина [22, 23].

Кроме того, ИЛ-6 повышает экспрессию CD163, сквенджер-рецептора, участвующего в утилизации комплекса гемоглобин-гаптоглобин [24]. Таким образом, ИЛ-6 влияет на поступление железа в макрофаги посредством увеличения поглощения железа через CD163, а также путём стимулирования трансмембранного импорта металла ДМТ-1 [25]. Другая важная функция ИЛ-6 – активация продукции гепцидина печенью.

Гепцидин освобождается, главным образом, печенью. Вместе с тем при индукции ИЛ-6 и липополисахаридами повышение продукции гепцидина

отмечают в моноцитах. Биологическое действие гепцидина опосредуется его связыванием с рецептором ферропортином, за которым следует быстрая интернализация и деградация лиганд-рецепторного комплекса. Удаление ферропортина из мембран останавливает клеточный экспорт железа из дуоденальных энтероцитов, макрофагов и гепатоцитов в циркуляцию. Без постоянного притока железа его плазменный уровень быстро истощается, что ограничивает доставку железа в созревающие эритроциты и, в конечном итоге, приводит к анемии [26-28].

АХЗ по распространенности занимает 2-е место среди анемий, после железодефицитной (ЖДА).

Важное практическое значение имеет разграничение АХЗ и ЖДА: некорректная трактовка пациента с АХЗ как имеющего дефицит железа влечет за собой неэффективную терапию железом с риском развития осложнений (перегрузки железом). Сходные клинические и лабораторные признаки осложняют их распознавание. Характерной чертой АХЗ является сочетание пониженного уровня железа сыворотки (гипоферремия) с достаточными его запасами в ретикулоэндотелиальной системе (РЭС) [29].

Микроцитоз при АХЗ (если он наблюдается) не достигает такой степени, как при ЖДА, может определяться анизо- и пойкилоцитоз, но обычно изменения формы и величины эритроцитов не столь значительны, как при ЖДА. Характерны снижение уровня железа в сыворотке крови, насыщение железом трансферрина ниже нормы, причем степень гипоферремии зависит от тяжести основного заболевания. В костно-мозговом пунктате, число сидеробластов снижено, напротив, число содержащих гемосидерин макрофагов повышено.

Встаёт вопрос о необходимости определения уровня цитокинов и гепцидина для более корректного диагностирования АХЗ. В отличие от пациентов с ЖДА, у которых содержание цитокинов и гепцидина снижено или находится в норме, у пациентов с АХЗ содержание гепцидина и цитокинов повышено. Улучшению диагностирования АХЗ, полагают, будет способствовать внедрение в практику методов: определения содержания гемоглобина в ретикулоцитах (CHr) и отношения уровня растворимых рецепторов трансферрина/ log сывороточного ферритина (sTfR/log sFt) [30-32]

Метод определения содержания гемоглобина в ретикулоцитах (CHr) – является чувствительным диагностическим тестом, который необходим при ранней диагностике железо-дефицитной анемии, а также при диагностике пациентов с острыми инфекциями или хроническими заболеваниями, у которых может развиваться АХЗ. Содержание гемоглобина в ретикулоцитах (CHr) < 28 пг соответствует функциональному дефициту железа. В настоящее время измерение данного показателя (CHr) проводится только на анализаторе Siemens Medical Solutions Diagnostics, Bayer.

При дифференциальной диагностике АХЗ и ЖДА необходимо определять сывороточный уровень ферритина. У пациентов с АХЗ уровень ферритина повышен, при сопутствующем дефиците железа он снижается, но никогда не бывает таким низким, как при ЖДА.

Определение в сыворотке крови уровня растворимых рецепторов трансферрина также способствует дифференциации АХЗ и ЖДА. При АХЗ уровень растворимых трансферриновых рецепторов в норме или понижен, при ЖДА он высокий, однако этот тест мало применяется в рутинной практике.

Для определения оптимальных терапевтических режимов лечения АХЗ необходимо внедрять в практику новые методы исследования.

Основными методами лечения анемии у онкологических больных являются гемотрансфузии и использование эритропоэтинов.

Гемотрансфузия или переливание аллогенной эритроцитной массы – эффективный и доступный метод лечения анемии. Несомненно, что он незаменим при угрожающих жизни состояниях: острой кровопотере, глубокой анемии (Hb < 80 г/л) или опасной для жизни (Hb < 65 г/л). Возможность быстрого восполнения числа циркулирующих эритроцитов и резкое увеличение кислородной емкости крови, а также относительная дешевизна и доступность – неоспоримые достоинства данного метода. Однако анемия злокачественного процесса, как правило, носит хронический характер, а частые гемотрансфузии существенно увеличивают риск возникновения побочных эффектов, таких как передача вирусных инфекций, аллергические и иммунологические реакции. [33-35]

Использование эритропоэтинов в лечении анемии злокачественного процесса удобный и достаточно эффективный способ коррекции уровня Hb.

На рынке лекарств уже несколько лет доступны эпрекс, нео-рекормон, эритростим. Активно исследуется новый стимулятор эритропоэза – дарбопозтин.

Несмотря на явные преимущества эритропоэтинов их эффективность показана лишь у 2/3 пациентов, эффект лечения наблюдается через 4 недели после применения.

По данным литературы, доля больных с АХЗ, отвечающих на терапию эритропоэтином, составляет 25% при миелодиспластическом синдроме, 30% — при множественной миеломе [36].

Вместе с тем, за последнее десятилетие применение эритропоэтинов сопровождается значительными побочными эффектами. Большой метаанализ, проведенный группой канадских ученых и опубликованный в 2009 г. [37] обобщил результаты 32 исследований, включавших в себя 12 006 больных. Наряду с очевидным эффектом терапии эритропоэтинами на качество жизни и частоту гемотрансфузий были подтверждены риски нежелательных явлений и смерти больных от прогрессирования опухолей. Относительный риск развития тромбозов во время лечения эритропоэтинами составил в данном исследовании 83%. В связи с этим, согласно рекомендациям ESMO (европейское общество клинической онкологии) [38,39], эритропоэтины могут применяться только у больных с анемией, являющейся осложнением химиотерапии. Начало терапии возможно при гемоглобине ниже 100 г/л или при анемии 1 ст., сопровождающейся выраженной клинической симптоматикой.

Неоднозначные эффекты эритропоэтина у онкологических пациентов стимулировали поиск новых подходов для лечения анемии воспаления. В экспериментальных и клинических испытаниях начато исследование

антицитокиновых препаратов как соединений способных корректировать анемию воспаления.

Применение моноклональных антител к ИЛ-6, гепцидину, фактору некроза опухолей в клинических и экспериментальных исследованиях приводило к повышению уровня гемоглобина и нормализации других гематологических показателей.

Для блокирования эффектов цитокинов, в частности ФНО- $\alpha$  использовали также ингибиторы молекул, участвующих в цитокин-опосредованной сигнальной передаче. Для повышения продукции эндогенного ЭПО и стимуляции эритроидной дифференцировки применяли ингибиторы GATA-2 [40]. Основываясь на участии p38 в ФНО- $\alpha$ -опосредованном ингибировании эритроидной дифференцировки, Miwatashi et al. применили новый ингибитор p38 TAK-715 в качестве анти-ФНО- $\alpha$  препарата для лечения ревматоидного артрита с анемическим синдромом.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Оценка эффективности лечения анемии у онкологических больных показала, что значительная часть пациентов не получает адекватного лечения, тогда как точный диагноз и соответствующая терапия могут привести к улучшению качества жизни, повышению эффективности и улучшению прогноза лечения. Очевидно, что особенности цитокинового профиля у онкологических больных могут обуславливать различия в механизмах, ограничивающих эритропоэз, нарушающих метаболизм железа и/или усиливающих обмен эритроцитов. В связи с этим дальнейшее изучение молекулярных механизмов, вносящих вклад в развитие анемии воспаления, позволит улучшить диагностику и будет способствовать разработке новых целенаправленных подходов к решению данной проблемы.

Большая частота встречаемости, разнообразие причин и механизмов развития анемии на фоне отмеченного в последнее время роста онкологических заболеваний, доказывает необходимость многостороннего исследования данного вопроса для разработки современных дифференциально-диагностических и прогностических критериев течения анемии, определения оптимальных патогенетически обоснованных методов лечения.

### Список литературы

1. Skillings J.R. An epidemiological review of red cell transfusions in cancer chemotherapy. / J.R. Skillings // *Cancer. Prev. Control.* – 1999 – Vol. 3. – P.207–212.
2. Coiffier B. Anemia Study Group. Predicting cancer-associated anemia in patients receiving non-platinum chemotherapy: results of a retrospective survey. / B. Coiffier, J. P. Guastalla, E. Pujade-Lauraine [et al.] // *Eur. J. Cancer.* – 2001 – Vol. 37. – P.1617–1623.
3. Ludwig H. The European Cancer Anemia Survey (ECAS): a large, multinational, prospective survey defining the prevalence, incidence, and treatment of anemia in cancer patients. / H. Ludwig // *Eur. J. Cancer*– 2004 – Vol. 40. – P. 293–306.
4. Birgegard G. Evaluation of anemia in patients with multiple myeloma and lymphoma: findings of the European Cancer Anemia Survey. / G. Birgegard, P. Gascon, H. Ludwig // *Eur. J. Hematology.* – 2006 – Vol. 77, № 5. – P. 378–386.
5. Kosmidis P. Prospective data from the European Cancer Anemia Survey (ECAS): focus on patients with lung cancer. / P. Kosmidis, M. Krzakowski // *Lung Cancer.* – 2003 – Vol. 41. – P. 265–288.

6. Schrijvers D. European Cancer Anemia Survey (ECAS): prospective evaluation of anemia in patients with gastrointestinal or colorectal cancer. / D. Schrijvers // Proc Euro School Oncology and Colorectal Cancer Confer. – 2002. – Vol. 2. – P. 71.
7. Richardson A. Fatigue in cancer patients: a review of the literature. / A. Richardson // Eur. J. Cancer. – 2005. – Vol. 4, № 1. – P. 20–32.
8. Stone P. Fatigue in patients with cancer. / P. Stone, M. Richards, J. Hardy // Eur. J. Cancer. – 2000. – Vol. 34, № 11. – P. 1670–1676.
9. Cella D. Factors influencing quality of life in cancer patients: anemia and fatigue. / D. Cella // Semin. Oncology. – 1998. – Vol. 25, № 7. – P. 43–46.
10. Stone P. Cancer-related fatigue: inevitable, unimportant and untreatable? Results of a multi-centre patient survey. / P. Stone // Cancer Fatigue Forum. Ann Oncology. – 2000. – Vol. 11. – P. 971–975.
11. Curt G.A. Impact of fatigue on quality of life in oncology patients. / G.A. Curt // Semin. Hematology. – 2000. – Vol. 37, № 4. – P. 14–17.
12. Harper P. Anemia of cancer: impact on patient fatigue and long-term outcome. / P. Harper, T. Littlewood // Oncology – 2005. – Vol. 69, № 2. – P. 2–7.
13. Caro J.J. Anemia as an independent prognostic factor for survival in patients with cancer: a systemic, quantitative review. / J.J. Caro, M. Salas, A. Ward, G. Goss // Cancer – 2001. – Vol. 91 – P. 2214 – 2221.
14. Dicato M. The optimal hemoglobin level in the cancer patient. / M. Dicato, P. Harper // Semin Oncology. – 2002. – Vol. 29, № 3. – P. 88 – 91.
15. Birk D. Levels of serum neopterin are increased in pancreatic cancer patients and correlate with the prognosis. / Birk D., Gansauge F., Gansauge S., et al. // Eur. J. Med Res – 2000. – Vol. 4 – P. 156 – 160.
16. Ludwig H. Symptomatology of anemia. / H. Ludwig, K. Strasser // Semin. Oncology. – 2001. – Vol. 28, № 2. – P. 7 – 14.
17. Waters J.S. Management of anemia inpatients receiving chemotherapy. / J.S. Waters, M.E. O'Brien, S. Ashley // J. Clin. Oncology. – 2002. – Vol. 20, № 2. – P. 601 – 603.
18. Obermair A. Impact of hemoglobin levels before and during concurrent chemotherapy on the response to treatment in patients with cervical cancer: preliminary results. / A. Obermair // Cancer – 2001. – Vol. 92. – P. 903 – 1908.
19. Grogan M. The importance of hemoglobin levels during radiotherapy for carcinoma of the cervix. / M. Grogan // Cancer – 1999. – Vol. 86, № 8. – P.1528 – 1536.
20. Green S. L. Tumor hypoxia and the cell cycle: implications for malignant progression and response to therapy. / S. L. Green, A. J. Giaccia // Cancer J. Sci. Am. – 1999. – Vol.4. – P.218–223.
21. Harris A. L. Hypoxia — a key regulatory factor in tumor growth. / A. L. Harris // Nat Rev Cancer – 2002. – Vol.2. – P.38–47.
22. Littlewood T. J. Impact of hemoglobin levels on treatment outcomes in patients with cancer. / T.J. Littlewood // Semin. Oncology. – 2001. – Vol.28. – P.49–53.
23. Montserrat E. B-cell chronic lymphocytic leukemia: recent progress in biology, diagnosis, and therapy. / E. Montserrat, F. Bosch, C. Rozman // Ann Oncology. – 2011. – Vol.8. – P.93–101.
24. Mercadante S. Anemia in cancer: pathophysiology and treatment. / S. Mercadante., V. Gebbia, A. Marrazzo [et al.] // Cancer Treat Rev. – 2011. – Vol.26. – P.303 – 311.
25. Groopman J. E. Chemotherapy-induced anemia in adults: incidence and treatment. / J. E. Groopman, L. M. Itri // J. Nat Cancer Inst. – 1999. – Vol.91. – P.1616 – 1634.
26. Tas F. Anemia in oncology practice: relation to disease and their therapies. / F. Tas // Am J. Clin. Oncology. – 2002. – Vol.25, № 4. – P.371 – 379.
27. Tanvetyanon T. Severity, risk factors, and physician practices in the management of anemia during concurrent chemo radiation for head and neck carcinoma. / T. Tanvetyanon, A. M. Choudhury // Cancer. – 2006. – Vol.106, № 7. – P.1554 – 1559.
28. Barrett-Lee P.J. Large-scale UK audit of blood transfusion requirements and anemia in patients receiving cytotoxic chemotherapy. / P. J. Barrett-Lee, N. P. Bailey, M. E. O'Brien // Brit. J. Cancer – 2012. – Vol.82. – P.93 – 97.
29. Nairz M. Molecular and clinical aspects of iron homeostasis: from anemia to hemochromatosis. / M. Nairz, G. Weiss // Wien Klin. Wochenschr – 2006. – Vol.118. – P.442 – 462.

30. Wardrop S.L. Interferon-gamma and lipopolysaccharide regulate the expression of Nramp2 and increase the uptake of iron from low relative molecular mass complexes by macrophages. / S. L. Wardrop, D.R. Richardson // Eur. J. Biochem. – 2000. – Vol. 67. – P.586 – 593.
31. Attiyah R. Comparative analysis of spontaneous and mycobacterial antigen-induced secretion of Th1, Th2 and pro-inflammatory cytokines by peripheral blood mononuclear cells of tuberculosis patients. / R. Attiyah, A. El-Shazly, A. S. Mustafa // Scand. J. Immunology. – 2012. – Vol. 75. – P.623 – 632.
32. Ludwiczek S. Cytokine-mediated regulation of iron transport in human monocytic cells. / S. Ludwiczek, E. Aigner, I. Theurl, et al. // Blood – 2003. – Vol. 41. – P.48 – 54.
33. Murr C. Neopterin as a marker for immune system activation. / C. Murr, B. Widner, B. Wirleitner // Curr. Drug. Metab. – 2002. – Vol. 3. – P.175 – 187.
34. Berdowska A. Neopterin measurement in clinical diagnosis. / A. Berdowska, K. Zwirska-Korczała // J. Clin. Pharm. Ther. – 2001. – Vol. 26. – P.319 – 329.
35. Berthoud T. Comparison of commercial kit to measure cytokine responses to Plasmodium falciparum by multiplex microsphere suspension array technology. / Berthoud T., Manaca M., Quelhas D. [et al.] // Malaria J. – 2011. – Vol. 10. – P. 115 – 122.
36. Pagel H. Effects of neopterin and 7, 8-dihydroneopterin on hypoxia-induced renal erythropoietin production. / H. Pagel, J. Fandrey, W. Schobersberger et al. // Eur. J. Hematology. – 2009. – Vol. 62. – P. 341 – 345.
37. Alvarez-Rodriguez L. Aging is associated with circulating cytokine dysregulation. / L. Alvarez-Rodriguez, M. Lopez-Hoyos, P. Munoz-Cacho et al. // Cell Immunology. – 2012. – Vol. 273. – P.124 – 132.
38. Johnson C. S. In vivo suppression of erythropoiesis by tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ): reversal with exogenous erythropoietin (EPO). / C. S. Johnson, C. A. Cook, P. Furmanski // Exp. Hematology. – 2009. – Vol. 18. – P.109 – 113.
39. Weiss G. Modification of iron regulation by the inflammatory response. / G. Weiss // Best Pract. Res. Clin. Hematology. – 2005. – Vol. 18. – P.183 – 201.
40. Spivak J. L. Iron and the anemia of chronic disease. / J. L. Spivak // Oncology – 2002. – Vol. 16. – P. 25 – 33.

## **MECHANISMS DEVELOPMENT OF ANAEMIA FOR ONCOLOGIC PATIENTS**

*Kusmenko E.V.*

*State Institution «Grigoriev Institute for Medical Radiology of National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kharkiv, Ukraine  
E-mail: kuzmenko@meta.ua*

Established in 2000 in the United States National Action Committee on anemia (NAAC) defines it as a public health problem that requires global attention and action. The present state of the problem of anemia of chronic disease in patients with cancer. Approximately 40% of patients noted in the diagnosis of anemia. AHZ frequency increases during radiotherapy, and in patients receiving chemotherapy, this figure reaches 90%. The most frequent and severe complications in the structure of therapy of malignant tumors are manifestations of hematologic toxicity, in particular the development of anemia of chronic disease. A significant increase in dose in most cases impossible because of side reactions caused by damage to normal organs and tissues. Close conjugation of therapeutic and toxic effects is the feature of the therapy of malignant tumors.

The mechanisms and the role of cytokines in the development provospolitelnyh anemia. According to modern concepts, the basis of immune-mediated mechanism is AHZ cytokines and cells of the reticuloendothelial system (RES) cause changes in iron homeostasis, the proliferation of erythroid progenitors, erythropoietin production and lifespan of red blood cells. Established hierarchy of the effects of various cytokines. When inflammation

cytokines stimulate immune cells, inducing the release of free radicals that have damaging effects on erythrocyte membrane. In addition, the cytokines activate macrophages to induce phagocytosis of damaged, more sensitive to phagocytosis of erythrocytes. One of the key factors in the pathogenesis AHZ is caused by cytokines violation of iron metabolism.

Different approaches to the diagnosis of anemia of chronic disease in patients with cancer. AHZ prevalence takes 2nd place of anemia after iron. Of great practical importance is the distinction AHZ and IDA: incorrect interpretation of a patient with AHZ as having iron deficiency results in ineffective therapy iron with risk of complications. To determine the optimal therapeutic regimens AHZ need to put into practice new methods of investigation.

Therefore, further study of the molecular mechanisms contributing to the development of anemia of inflammation, improve detection and facilitate the development of new targeted approaches to solving this problem.

**Keywords:** anaemia, cytokiny, oncology.

### References

1. Skillings J. R. An epidemiological review of red cell transfusions in cancer chemotherapy. *Cancer. Prev. Control.*, **3**, 207–212 (1999).
2. Coiffier B., Guastalla J. P., Pujade-Lauraine E. Anemia Study Group. Predicting cancer-associated anemia in patients receiving non-platinum chemotherapy: results of a retrospective survey. *Eur. J. Cancer*, **37**, 1617–1623 (2001).
3. Ludwig H. The European Cancer Anemia Survey (ECAS): a large, multinational, prospective survey defining the prevalence, incidence, and treatment of anemia in cancer patients. *Eur. J. Cancer*, **40**, 293–306 (2004).
4. Birgegard G., Gascon P., Ludwig H. Evaluation of anemia in patients with multiple myeloma and lymphoma: findings of the European Cancer Anemia Survey. *Eur. J. Hematology*, **77**, 5, 378–386 (2006).
5. Kosmidis P., Krzakowski M. Prospective data from the European Cancer Anemia Survey (ECAS): focus on patients with lung cancer. *Lung Cancer*. **41**, 265–288 (2003).
6. Schrijvers D. European Cancer Anemia Survey (ECAS): prospective evaluation of anemia in patients with gastrointestinal or colorectal cancer. *Proc Euro School Oncology and Colorectal Cancer Confer*, **2**, 71 (2002).
7. Richardson A. Fatigue in cancer patients: a review of the literature. *Eur. J. Cancer*, **4**, 1, 20–32 (2005).
8. Stone P., Richards M., Hardy J. Fatigue in patients with cancer. *Eur. J. Cancer*, **34**, 11, 1670–1676 (2000).
9. Cella D. Factors influencing quality of life in cancer patients: anemia and fatigue. *Semin. Oncology*, **25**, 7, 43–46 (1998).
10. Stone P. Cancer-related fatigue: inevitable, unimportant and untreatable? Results of a multi-centre patient survey. *Cancer Fatigue Forum. Ann Oncology*, **11**, 971–975 (2000).
11. Curt G.A. Impact of fatigue on quality of life in oncology patients. *Semin. Hematology*, **37**, 4, 14–17 (2000).
12. Harper P., Littlewood T. Anemia of cancer: impact on patient fatigue and long-term outcome, *Oncology*, **69**, 2, 2 – 7 (2005).
13. Caro J.J., Salas M., Ward A., Goss G. Anemia as an independent prognostic factor for survival in patients with cancer: a systemic, quantitative review, *Cancer*, **91**, 2214 – 2221 (2001).
14. Dicato M., Harper P. The optimal hemoglobin level in the cancer patient, *Semin Oncology*, **29**, 3, 88 – 91 (2002).
15. Birk D., Gansauge F., Gansauge S. Levels of serum neopterin are increased in pancreatic cancer patients and correlate with the prognosis, *Eur. J. Med Res*, **4**, 156 – 160 (2000).
16. Ludwig H., Strasser K. Symptomatology of anemia, *Semin. Oncology*, **28**, 2, 7 – 14 (2001).
17. Waters J.S., O'Brien M.E., Ashley S. Management of anemia inpatients receiving chemotherapy, *J. Clin. Oncology*, **20**, 2, 601 – 603 (2002).

18. Obermair A. Impact of hemoglobin levels before and during concurrent chemotherapy on the response to treatment in patients with cervical cancer: preliminary results, *Cancer*, **92**, 903 – 1908 (2001).
19. Grogan M. The importance of hemoglobin levels during radiotherapy for carcinoma of the cervix, *Cancer*, **86**, 8, 1528 – 1536 (1999).
20. Green S. L., Giaccia A. J. Tumor hypoxia and the cell cycle: implications for malignant progression and response to therapy, *Cancer J. Sci. Am.*, **14**, 218–223 (1999).
21. Harris A. L. Hypoxia — a key regulatory factor in tumor growth, *Nat Rev Cancer*, **12**, 38–47 (2002).
22. Littlewood T. J. Impact of hemoglobin levels on treatment outcomes in patients with cancer, *Semin. Oncology*, **28**, 49–53 (2001).
23. Montserrat E., Bosch F., Rozman C. B-cell chronic lymphocytic leukemia: recent progress in biology, diagnosis, and therapy, *Ann Oncology*, **8**, 93–101 (2011).
24. Mercadante S., Gebbia V., Marrazzo A. Anemia in cancer: pathophysiology and treatment, *Cancer Treat Rev*, **26**, 303 – 311 (2011).
25. Groopman J. E., Itri L. M. Chemotherapy-induced anemia in adults: incidence and treatment, *J. Nat Cancer Inst*, **91**, 1616 – 1634 (1999).
26. Tas F. Anemia in oncology practice: relation to disease and their therapies, *Am J. Clin. Oncology*, **25**, 4, 371 – 379 (2002).
27. Tanvetyanon T., Choudhury A. M. Severity, risk factors, and physician practices in the management of anemia during concurrent chemo radiation for head and neck carcinoma, *Cancer*, **106**, 7, 1554 – 1559 (2006).
28. Barrett-Lee P.J., Bailey N. P., O'Brien M. E. Large-scale UK audit of blood transfusion requirements and anemia in patients receiving cytotoxic chemotherapy, *Brit. J. Cancer*, **82**, 93 – 97 (2012).
29. Nairz M., Weiss G. Molecular and clinical aspects of iron homeostasis: from anemia to hemochromatosis, *Wien Klin. Wochenschr*, **118**, 442 – 462 (2006).
30. Wardrop S.L., Richardson D. R. Interferon-gamma and lipopolysaccharide regulate the expression of Nramp2 and increase the uptake of iron from low relative molecular mass complexes by macrophages, *Eur. J. Biochem*, **67**, 586 – 593 (2000).
31. Attiyah R., El-Shazly A., Mustafa A. S. Comparative analysis of spontaneous and mycobacterial antigen-induced secretion of Th1, Th2 and pro-inflammatory cytokines by peripheral blood mononuclear cells of tuberculosis patients, *Scand. J. Immunology*, **75**, 623 – 632 (2012).
32. Ludwiczek S., Aigner E., Theurl I. Cytokine-mediated regulation of iron transport in human monocytic cells, *Blood*, **41**, 48 – 54 (2003).
33. Murr C., Widner B., Wirleitner B. Neopterin as a marker for immune system activation, *Curr. Drug. Metab*, **3**, 175 – 187 (2002).
34. Berdowska A., Zwirska-Korcza K. Neopterin measurement in clinical diagnosis, *J. Clin. Pharm. Ther*, **26**, 319 – 329 (2001).
35. Berthoud T., Manaca M., Quelhas D. Comparison of commercial kit to measure cytokine responses to Plasmodium falciparum by multiplex microsphere suspension array technology, *Malaria J*, **10**, 115 – 122 (2011).
36. Pagel H., Fandrey J., Schobersberger W. Effects of neopterin and 7, 8-dihydroneopterin on hypoxia-induced renal erythropoietin production, *Eur. J. Hematology*, **62**, 341 – 345 (2009).
37. Alvares-Rodriguez L., Lopez-Hoyos M., Munoz-Cacho P. Aging is associated with circulating cytokine dysregulation, *Cell Immunology*, **273**, 124 – 132 (2012).
38. Johnson C. S., Cook C. A., Furmanski P. In vivo suppression of erythropoiesis by tumor necrosis factor alpha (TNF-alfa): reversal with exogenous erythropoietin (EPO), *Exp. Hematology*, **18**, 109 – 113 (2009).
39. Weiss G. Modification of iron regulation by the inflammatory response, *Best Pract. Res Clin. Hematology*, **18**, 183 – 201 (2005).
40. Spivak J. L. Iron and the anemia of chronic disease, *Oncology*, **16**, 25 – 33 (2002).

Поступила в редакцию 09.09.2014 г.

**УДК 612.821**

## **НЕЙРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РАЗВИТИЯ ЭМОЦИОНАЛЬНОЙ СФЕРЫ ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА**

*Куленкова А.А., Дягилева Ю.О., Павленко В.Б.*

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

В статье представлены результаты исследования электроэнцефалографических (ЭЭГ) коррелят индивидуальных особенностей развития эмоциональной сферы у детей возрастом от 17 до 38 месяцев (n=50). Изучали взаимосвязи факторов темперамента (Негативная эмоциональность, Экстраверсия, Самоконтроль) с относительной мощностью (ОМ) тета-, альфа-, бета- и гамма-ритмов ЭЭГ. Выявлено, что Негативная эмоциональность отрицательно, а Экстраверсия – положительно коррелировали с высокочастотными бета- и гамма-ритмами ЭЭГ, что свидетельствует о вкладе указанных факторов темперамента детей в активацию когнитивных процессов. Однако наиболее тесно ОМ ритмов ЭЭГ исследованных детей связана с фактором Самоконтроль, уровень которого отрицательно коррелирует с ОМ тета- и положительно с ОМ альфа- и бета-ритмов. Данные корреляты могут быть использованы как объективные показатели индивидуальных личностных особенностей эмоциональной сферы у детей раннего возраста.

**Ключевые слова:** электроэнцефалограмма, дети, темперамент.

### **ВВЕДЕНИЕ**

Проявление индивидуально-типологических особенностей эмоциональной сферы личности (темперамента) происходит уже в первые годы жизни. Способность к выражению и самоконтролю эмоций активно развивается в период раннего детства и имеет особое значение на данном этапе развития, так как является предпосылкой для формирования адекватного и адаптивного социального поведения ребенка [1]. Морфологической основой аффективной системы является группа тесно взаимосвязанных корковых и подкорковых структур [2]. Таким образом, свойства темперамента обусловлены различиями в возбудимости разных структур ЦНС и могут отражаться в паттерне ЭЭГ [3]. Исследования нейрофизиологических механизмов отвечающих за нормальное развитие эмоциональной сферы на ранних этапах развития ребенка в настоящее время немногочисленны и большей частью направлены на выявление взаимосвязей характеристик темперамента со значениями показателя ЭЭГ-асимметрии [4-6]. Однако, взаимосвязи между выраженностью измерений темперамента у детей и другими характеристиками паттерна ЭЭГ изучены недостаточно. В связи с этим, целью данной работы явилось исследование взаимосвязей факторов темперамента с ОМ ритмов ЭЭГ у детей раннего возраста.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие 50 детей из полных семей возрастом от 17 до 38 месяцев. Половозрастной состав групп, чьи ЭЭГ-данные были отобраны для дальнейшего анализа, представлен ниже. В обследованные группы не были включены дети: с массой тела при рождении менее 2.5 кг, с наличием генетических заболеваний, с наличием записей в медицинской карточке о заболеваниях ЦНС и с зарегистрированным фетальным алкогольным синдромом, а также левши (рисующие левой рукой).

Для определения характеристик темперамента родителям предлагали заполнить полную версию адаптированного русскоязычного опросника для изучения темперамента детей раннего возраста (опросник поведения в раннем детстве – ОПРД) [7; 8]. ОПРД заполняется родителями детей, возраст которых составляет от 17 до 37 месяцев. Опросник содержит 201 вопрос о выраженности разных элементов поведения у ребенка. Родители дают ответы исходя из семибальной шкалы: 1 – такое поведение не встречается никогда, 2 – очень редко, 3 – меньше половины времени, 4 – около половины времени, 5 – больше половины времени, 6 – всегда. С помощью ОПРД оценивают три фактора темперамента: Отрицательную эмоциональность (Negative affectivity), Экстраверсию (Surgency / Extraversion) и Саморегуляцию (Effortful Control). Вышеперечисленные факторы сопоставимы с такими факторами личности взрослого человека как, нейротизм, экстраверсия, и сдержанность/сознательность (Constraint/Conscientiousness) [9; 7]. Подробное описание факторов приведено нами ранее в предыдущей работе [10].

Текущую ЭЭГ регистрировали в состоянии спокойного бодрствования ребенка при открытых глазах. Регистрация ЭЭГ при закрытых глазах у детей такого возраста не проводилась, поскольку убедить их закрыть глаза было невозможно. Во время записи дети сидели на руках у родителя. Чтобы уменьшить степень отвлечения на посторонние стимулы им с экрана компьютера показывали видеозапись вращающегося мяча с меняющимся геометрическим рисунком. Регистрацию ЭЭГ осуществляли с помощью компьютерного телеметрического электроэнцефалографа («Тредекс»). Для обработки и анализа ЭЭГ использовали программу «EEG Mapping 6», разработанную в лаборатории нейроэтологии Таврического национального университета им. В. И. Вернадского (программист Е. Н. Зинченко). ЭЭГ-потенциалы отводили монополярно от префронтальных (Fp<sub>1</sub>, Fp<sub>2</sub>), фронтальных (F<sub>3</sub>, F<sub>4</sub>), задних ниже-лобных (F<sub>7</sub>, F<sub>8</sub>), центральных (C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>), средне-височных (T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>), задне-височных (T<sub>5</sub>, T<sub>6</sub>), теменных (P<sub>3</sub>, P<sub>4</sub>) и затылочных (O<sub>1</sub>, O<sub>2</sub>) локусов в соответствии с международной системой «10–20». В качестве референтного электрода в каждом случае использовали все электроды, кроме активного, объединенные вместе. Нейтральный («заземляющий») электрод располагали между локусами C<sub>3</sub> и C<sub>4</sub>. Частоты среза фильтров высоких и низких частот составляли соответственно 1.5 и 48 Гц, частота оцифровки ЭЭГ-сигналов – 250 с<sup>-1</sup>. Сигналы обрабатывали с помощью быстрых преобразований Фурье; применялось сглаживание по методу Блэкмена. Длительность каждой записи составляла 60 с. Отрезки ЭЭГ подвергали предварительному визуальному контролю; артефакты, связанные с движениями, удаляли. Записи ЭЭГ, полученные у отдельных детей и

содержащие большое количество артефактов, исключались из обработки и не входили в общую выборку. В конечном счете, для обработки были отобраны записи ЭЭГ 37 детей (20 мальчиков и 17 девочек, средний возраст  $29,1 \pm 1,4$  месяцев).

В связи с тем, что у детей только развиваются генераторные структуры мозга, и частотные границы диапазонов ритмов достигают значения взрослых лишь к шести годам, то для детей возрастом от 17 до 24 месяцев мы определяли значения ОМ в следующих диапазонах: тета-ритм (3-5 Гц) [11], альфа-ритм (6-9 Гц) [12; 11], бета-ритм (10-25 Гц) [13] и гамма-ритм (25-40 Гц) [14]. Для детей возрастом 24 – 38 месяцев ОМ оценивали в следующих диапазонах: тета-ритм (4-6 Гц) [11], альфа-ритм (7-10 Гц) [12; 11], бета-ритм (11-29 Гц) [13] и гамма-ритм (30-45 Гц) [14]. Поскольку среди осцилляций, соответствующих дельта-ритму, могли присутствовать артефакты, связанные с движениями, данный ритм в работе не рассматривался. В результате, в зависимости от возраста ребенка, менялись и частотные диапазоны ритмов. Испытуемые возрастом до 24 месяцев составляли 19 человек из 37. При выполнении статистического анализа значения ЭЭГ показателей группировали по принадлежности к ритму ЭЭГ, а не в зависимости от возраста. ОМ для каждого ритма ЭЭГ рассчитывалась как отношение мощности отдельного ритма к сумме мощностей всех исследованных ритмов диапазона 4–45 Гц в данном отведении, подобно тому, как это делали при исследовании румынских детей [15]. Указанный показатель отражает относительный вклад конкретного ритма в общую электрическую активность в определенном отведении ЭЭГ. Считается, что использование показателей ОМ минимизирует индивидуальные различия абсолютной мощности ЭЭГ, связанные с возрастом, толщиной черепа и другими анатомическими факторами [16].

Все исследования проводили в течение двух дней в удобное для ребенка время. В первый день с ребенком старались установить контакт и проводили оценку эмоционального развития (родителям предлагали заполнить ОПРД). Запись ЭЭГ осуществлялась во второй день.

Результаты электрофизиологического исследования количественно обрабатывались с использованием стандартных приемов вариационной статистики. Поскольку распределение данных в ряде случаев отличалось от нормального, статистическую обработку проводили с использованием корреляционного анализа по Спирмену. Достоверными считали корреляции при  $p \leq 0,05$ .

Группа испытуемых детей была набрана с помощью объявлений, размещенных в детских садах г. Симферополя. Родителям этих детей были предоставлены все необходимые сведения о процедуре исследования, и они дали письменное согласие на бесплатное участие ребенка в данных экспериментах. Настоящее исследование соответствовало этическим принципам Хельсинкской декларации 1964 г. и было одобрено этическим комитетом Таврического национального университета им. В. И. Вернадского.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного исследования выявлено, что средние значения факторов темперамента у детей возрастом от 17 до 38 месяцев составляют: Негативная эмоциональность –  $2,87 \pm 0,05$ ; Экстраверсия –  $5,20 \pm 0,07$ ; Самоконтроль –  $4,44 \pm 0,08$ .

Корреляционный анализ позволил выявить взаимосвязи между ОМ ритмов ЭЭГ и факторами темперамента у детей раннего возраста. На рис. 1. представлены диаграммы коэффициентов корреляций между ОМ ритмов ЭЭГ и уровнем Негативной эмоциональности. Были выявлены значимые отрицательные связи данного фактора с ОМ бета- и гамма-ритмов ЭЭГ. Для ОМ бета-ритма корреляции с Негативной эмоциональностью достигали уровня значимости в центральном отведении левого полушария (C<sub>3</sub>:  $r = -0,43$ ;  $p = 0,01$ ), а для ОМ гамма-ритма – в заднелобном (F<sub>3</sub>:  $r = -0,36$ ;  $p = 0,02$ ) и центральном (C<sub>3</sub>:  $r = -0,39$ ;  $p = 0,02$ ) отведениях левого полушария, а также в задневисочных отведениях обоих полушарий (T<sub>5</sub>:  $r = -0,33$ ;  $p = 0,04$ ; T<sub>6</sub>:  $r = -0,42$ ;  $p = 0,01$ ).

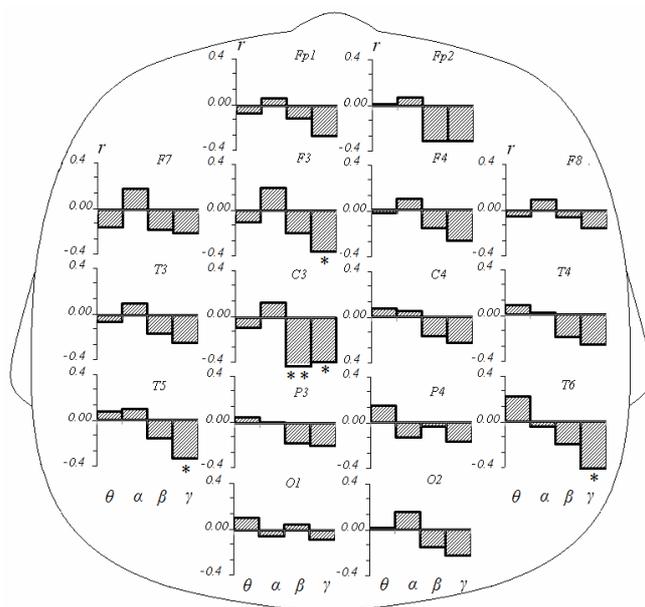


Рис 1. Диаграммы коэффициентов корреляций между относительной мощностью ритмов ЭЭГ и уровнем Негативной эмоциональности у детей раннего возраста. Каждая диаграмма соответствует определенному локусу отведения. По горизонтали – ритмы ЭЭГ (тета-, альфа-, бета- и гамма-); по вертикали – значения коэффициента корреляции. Звездочками отмечены корреляции достигшие статистической достоверности (\* -  $P \leq 0.05$ , \*\* -  $P \leq 0.01$ ).

Выявленные отрицательные корреляции с ОМ бета-ритма были для нас несколько неожиданными поскольку в работах на взрослых было выявлено, что повышенная мощность бета1- и бета2-ритмов в центральных регионах и во

фронтальных отведениях левого полушария является индикатором неблагоприятного психофизиологического состояния человека, постоянных тревожных мыслей и переживаний [17]. Негативная эмоциональность у детей (соответствующая Нейротизму), как и у взрослых, является фактором определяющим предрасположенность к эмоциональным проблемам, связанным с отрицательными эмоциями – тревогой, депрессией, страхами и психосоматическими симптомами [8]. В последнее время высокочастотные бета- и гамма-ритмы связывают с активацией процессов сознания – высоким уровнем произвольного внимания, а также с высоким уровнем развития когнитивных способностей [18; 2]. Эмоции у взрослых в значительной степени осознаются, что и приводит к активации высокочастотных ритмов ЭЭГ. Логично предположить, что у маленьких детей эти процессы проходят менее осознанно, чем у взрослых, что и обуславливает отрицательные корреляции Негативной эмоциональности с ОМ бета-ритма ЭЭГ. Можно предположить, что у детей высокий уровень негативной эмоциональности препятствует адекватному развитию когнитивных процессов (памяти, внимания, мышления и т.д.).

Нами были выявлены корреляции между ОМ ритмов ЭЭГ и уровнем Экстраверсии у детей раннего возраста (Рис 2.).

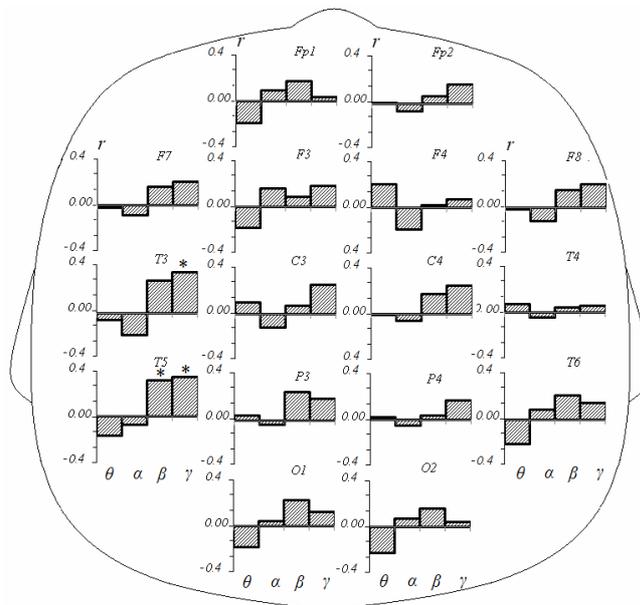


Рис 2. Диаграммы коэффициентов корреляций между относительной мощностью ритмов ЭЭГ и уровнем Экстраверсии у детей раннего возраста. Каждая диаграмма соответствует определенному локусу отведения. По горизонтали – ритмы ЭЭГ (тета-, альфа-, бета- и гамма-); по вертикали – значения коэффициента корреляции. Звездочками отмечены корреляции достигшие статистической достоверности (\* -  $P \leq 0.05$ , \*\* -  $P \leq 0.01$ ).

Как видно из Рис. 2 уровень Экстраверсии достоверно и положительно коррелировал с ОМ бета- и гамма-ритмов ЭЭГ. Для ОМ бета-ритма уровня значимости корреляции достигали в левом задневисочном отведении ( $T_5$ :  $r= 0,32$ ;  $p=0,05$ ). Ранее в нашей лаборатории было показано, что у детей возрастом 10-11 лет наблюдается возрастание мощности бета-ритма при мысленном переживании положительных эмоций [19]. Вероятно, экстравертированные дети относились к процедуре записи ЭЭГ более положительно по сравнению с интровертированными, что сопровождалось более выраженным бета-ритмом. Для ОМ гамма-ритма значимые положительные корреляции с уровнем Экстраверсии были выявлены в височном ( $T_3$ :  $r= 0,36$ ;  $p=0,02$ ) и задневисочном ( $T_5$ :  $r=0,34$ ;  $p=0,04$ ) отведениях левого полушария. Экстраверсия связана с поиском новизны и любознательности, что приводит к активации восприятия, внимания, мышления и других когнитивных процессов. В итоге это отражается в большей выраженности высокочастотных ритмов у более экстравертированных детей.

На Рис. 3 представлены диаграммы коэффициентов корреляций между ОМ ритмов ЭЭГ и уровнем Самоконтроля.

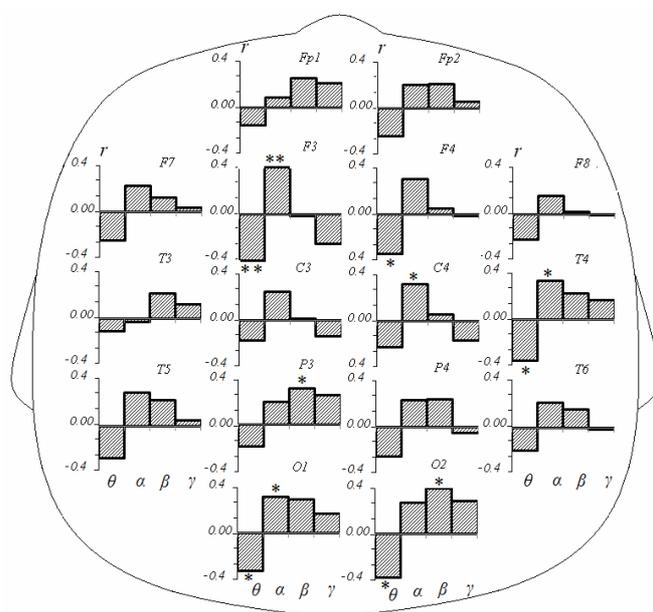


Рис 3. Диаграммы коэффициентов корреляций между относительной мощностью ритмов ЭЭГ и уровнем Самоконтроля у детей раннего возраста. Каждая диаграмма соответствует определенному локусу отведения. По горизонтали – ритмы ЭЭГ (тета-, альфа-, бета- и гамма-); по вертикали – значения коэффициента корреляции. Звездочками отмечены корреляции достигшие статистической достоверности (\* -  $P \leq 0.05$ , \*\* -  $P \leq 0.01$ ).

У испытуемых наблюдались значимые корреляции данного фактора с тета-, альфа-, и бета-ритмами ЭЭГ. Для ОМ тета-ритма были зарегистрированы

отрицательные корреляции с уровнем Самоконтроля в заднелобных ( $F_3$ :  $r = -0,40$ ;  $p = 0,01$ ;  $F_4$ :  $r = -0,34$ ;  $p = 0,04$ ) и затылочных ( $O_1$ :  $r = -0,33$ ;  $p = 0,04$ ;  $O_2$ :  $r = -0,38$ ;  $p = 0,02$ ) отведениях обоих полушарий и в височном отведении правого полушария ( $T_4$ :  $r = -0,36$ ;  $p = 0,03$ ). Между уровнем Самоконтроля и ОМ альфа-ритма были выявлены положительные корреляции в заднелобном ( $F_3$ :  $r = 0,42$ ;  $p = 0,01$ ) и затылочном ( $O_1$ :  $r = 0,32$ ;  $p = 0,05$ ) отведениях левого полушария, и в центральном ( $C_4$ :  $r = 0,33$ ;  $p = 0,05$ ) и височном ( $T_4$ :  $r = 0,34$ ;  $p = 0,04$ ) отведениях правого полушария. Известно, что высокий тета-ритм связан с высоким уровнем тревожности и эмоциональными переживаниями, а высокий альфа-ритм – с состоянием расслабления [2]. В нашем исследовании отрицательные корреляции уровня Самоконтроля с тета-ритмом, и положительные с альфа-ритмом ЭЭГ свидетельствуют о том, что чем выше у ребенка способность к контролю эмоций и поведения, тем менее он тревожен. Для ОМ бета-ритма были выявлены положительные корреляции с уровнем Самоконтроля в левом теменном ( $P_3$ :  $r = 0,31$ ;  $p = 0,05$ ) и правом затылочном ( $O_2$ :  $r = 0,39$ ;  $p = 0,02$ ) отведениях. В данном случае положительные корреляции с бета-ритмом, свидетельствуют о том, что чем выше Самоконтроль, тем выше уровень когнитивных способностей у ребенка. Отметим, что значимые корреляции между уровнем Самоконтроля и ОМ ритмов ЭЭГ были наиболее частыми и тесными по сравнению с другими факторами темперамента. Вероятно, на данном этапе развития ребенка ключевым фактором формирования темперамента является созревание структур мозга ответственных за способность контролировать свои эмоции.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Полученные нами результаты свидетельствуют о наличии значимых связей между спектральными характеристиками ЭЭГ и факторами темперамента (Негативная эмоциональность, Экстраверсия, Самоконтроль) у детей раннего возраста.
2. Выявлено, что Негативная эмоциональность отрицательно, а Экстраверсия – положительно коррелировали с высокочастотными бета- и гамма-ритмами ЭЭГ. Указанные факты свидетельствуют о вкладе данных факторов темперамента детей в активацию когнитивных процессов. Однако наиболее часто и тесно ОМ ритмов ЭЭГ исследованных детей связана с фактором Самоконтроль, уровень которого отрицательно коррелирует с тета- и положительно с альфа- и бета-ритмами. Вероятно, на данном этапе развития ребенка ключевым фактором формирования темперамента является созревание структур мозга ответственных за способность контролировать свои эмоции.
3. Данные корреляты могут быть использованы как объективные показатели индивидуальных личностных особенностей развития эмоциональной сферы у детей раннего возраста.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (региональный проект № 14-46-01050).

Список литературы

1. Fox N.A. The development of self-control of emotion: intrinsic and extrinsic influences / N.A. Fox, S.D. Calkins // *Motivation and Emotion*. – 2003. – Vol. 27, No 1. – P. 7-26.
2. Kropotov Yu.D. Quantitative EEG, Event-Related Potentials and Neurotherapy. Academic Press. Elsevier. – 2009.
3. McManis M. H. EEG asymmetry, power, and temperament in children / M.H. McManis, J. Kagan, N.C. Snidman [et al.] // *Dev. Psychobiol.* – 2002. – Vol. 41. – P. 169-177.
4. Fox N.A. Neural plasticity and development in the first two years of life: evidence from cognitive and socioemotional domains of research / N.A. Fox, S.D. Calkins, M.A. Bell // *Dev. and Psychopathol.* – 1994. – Vol. 6. – P. 677-696.
5. Kim K. J. Frontal EEG asymmetry and regulation during childhood / K.J. Kim, M.A. Bell // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 2006. – Vol. 1094. – P. 308-312.
6. LoBue V. Prefrontal Asymmetry and parent-rated temperament in infants / V. LoBue, J.A. Coan, C. Thrasher [et al.] // *PLoS One*. – 2011. – Vol 6(7): e22694.
7. Putnam S. P. Measurement of fine-grained aspects of toddler temperament: The early childhood behavior questionnaire / S. P. Putnam, M. A. Gartstein, M. K. Rothbart // *Inf. Behavior and Dev.* – 2006. – Vol. 29. – P. 386–401.
8. Колмагорова А. В. Адаптация русскоязычной версии опросника для изучения темперамента детей раннего возраста / А. В. Колмагорова, Е. П. Слободская, М. Э. Гарштейн // *Психологический журнал*. – 2008. – Т. 29, No 6. – С. 82-87.
9. Digman J. M. Personality structure: Emergence of the five-factor model / J. M. Digman // *An. Rev. of Psychol.* – 1990. – Vol. 41. – P. 417–440.
10. Куленкова А. А. Взаимосвязь темперамента детей первых лет жизни с их физиологическими особенностями / А. А. Куленкова, В. Б. Павленко // *Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия»*. – 2013. – Т. 26 (65), No 2. – С. 107-114.
11. Marshall P. J. Development of the EEG from 5 months to 4 years of age / P. J. Marshall, Y. Bar-Haim, N.A. Fox // *Clinical Neurophysiology*. – 2002. – Vol. 113. – P. 1199-1208.
12. Stroganova T. A. EEG alpha rhythm in infants / T.A. Stroganova, E.V. Orekhova, I.N. Posikera // *Clinical Neurophysiology*. – 1999. – V. 110, No 6. – P. 997-1012.
13. Cuevas K. A frequency band analysis of two year olds` memory processes / K. Cuevas, V. Raj, M.A. Bell // *International Journal of Psychophysiology*. – 2012. – V. 83, No 3. – P. 315.
14. Gou Z. Resting frontal gamma power at 16, 24 and 36 months predicts individual differences in language and cognition at 4 and 5 years/ Z. Gou, N. Choundhury, A. A. Benasich // *Behavioural Brain Research*. – 2011. – Vol. 220, No 2. – P. 263-270.
15. Marshall P. J. The Bucharest Early Intervention Project core group. A comparison of the electroencephalogram between institutionalized and community children in Romania / P.J. Marshall, N.A. Fox // *Journal of Cognitive Neuroscience*. – 2004. – Vol. 16, No 8. – P. 1327-1338.
16. McLaughlin K.A. Delayed maturation in brain electrical activity partially explains the association between early environmental deprivation and symptoms of attention-deficit/hyperactivity disorder / K.A. McLaughlin, N.A. Fox, C.H. Zeanah [et al.] // *Biological Psychiatry*. – 2010. – Vol. 68, No 4. – P. 336.
17. Павленко О. М. Використовування характеристик ЕЕГ для об'єктивного визначення рівня тривоги і страху у клієнтів психологічного консультування / О. М. Павленко // *Актуальні проблеми психології (Психофізіологія. Психологія праці. Експериментальна психологія)*. – 2010. – Т. 5, No 10. – С. 175-180.
18. Benasich A.A. Early cognitive and language skills are linked to resting frontal gamma power across the first 3 years / A.A. Benasich, Z. Gou, N. Choundhury [et al.] // *Behav. Brain. Res.* – 2008. – Vol. 195 (2). – P. 215-222.
19. Алиева Т. А. Отражение воспроизведения эмоциональных переживаний в паттерне ЭЭГ у детей 10-12 лет / Т. А. Алиева, Е. В. Эйсмонт, В. Б. Павленко // *Нейрофизиология/Neurophysiology*. – 2011. – Т. 43, No 4. – С. 380-382.

## NEUROPHYSIOLOGICAL ANALYSIS OF EMOTIONAL SPHERE DEVELOPMENT IN EARLY CHILDHOOD

*Kulenkova A.A., Dyagileva Ju.O., Pavlenko V.B.*

*Taurida National V.I. Vernadsky University, Simferopol, Crimea, Russia  
E-mail: anna.kulenkova@gmail.com*

The article presents the results of correlation analysis between EEG properties and individual peculiarities of emotional sphere development in children aged from 17 to 38 months (n=50). To measure the temperamental characteristics there was used the full adapted version of The Early Childhood Behavior Questionnaire. The EEG was recorded in children during resting wakefulness with open eyes. The EEG relative power in the children aged from 17 to 24 months was calculated for the following frequency bands: theta-rhythm (3-5 Hz), alpha-rhythm (6-9 Hz), beta-rhythm (10-25 Hz), and gamma-rhythm (25-40 Hz); for 24-38 months old children: theta-rhythm (4-6 Hz), alpha-rhythm (7-10 Hz), beta-rhythm (11-29 Hz), and gamma-rhythm (30-45 Hz).

The average values of the temperamental factors in children were found to be as follows: Negative affectivity -  $2,87 \pm 0,05$ ; Surgency / Extraversion -  $5,20 \pm 0,07$ ; Effortful Control -  $4,44 \pm 0,08$ . Statistical analysis revealed significant correlations between the temperamental factors and relative power of EEG rhythms. The high-frequency beta-rhythm correlated positively with Extraversion and negatively with Negative affectivity, which was interpreted as evidence that these temperamental factors could modify the processes of cognitive activation. The Effortful Control factor correlated negatively with theta-rhythm and positively with alpha- and beta-rhythms. The negative correlations between Effortful Control and theta-rhythm together with the positive correlations between this factor and alpha-rhythm relative powers in children can be interpreted so that lower anxiety level is usually accompanied with the more developed capacity to control one's emotions and behavior. The positive correlation with beta-rhythm relative power could testify that cognitive abilities in children are more pronounced in case of more developed Effortful Control. It is to note that the factor of Effortful Control demonstrated the biggest number of stronger correlations with EEG relative power if compared to the other two temperamental factors. It is hypothesized that during early childhood the key factor of temperamental formation is the development of brain structures responsible for emotional Effortful Control. The discovered correlations may prove useful as objective indicators of individual emotional sphere properties during early childhood.

**Keywords:** electroencephalogram, children, temperament.

### References

1. Fox N.A., Calkins S.D., The development of self-control of emotion: intrinsic and extrinsic influences, *Motivation and Emotion*, **27**, 1, 7 (2003).
2. Kropotov Yu. D. Quantitative EEG, Event-Related Potentials and Neurotherapy (Academic Press. Elsevier, 2009).
3. McManis M.H., Kagan J., Shidman N.C., Woodward S.A., EEG asymmetry, power, and temperament in children, *Dev. Psychobiol.*, **41**, 169 (2002).
4. Fox N.A., Calkins S.D., Bell M.A., Neural plasticity and development in the first two years of life: evidence from cognitive and socioemotional domains of research, *Dev. and Psychopathol.*, **6**, 677 (1994).

5. Kim K.J., Bell M.A., Frontal EEG asymmetry and regulation during childhood, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1094**, 308 (2006).
6. LoBue V., Coan J.A., Thrasher C., DeLoache J., Prefrontal Asymmetry and parent-rated temperament in infants, *PLoS One*, **6**(7): e22694, (2011).
7. Putnam S.P., Gartstein M.A., Rothbart M.K., Measurement of fine-grained aspects of toddler temperament: The early childhood behavior questionnaire, *Inf. Behavior and Dev.*, **29**, 386 (2006).
8. Kolmagorova A.V., Slobodskaya E.R., Gatstein M.A., Adptatsiya russkoyazychnoy versii oprosnika dlya izucheniya temperamenta detey rannego vozrasta, *Psyhologicheskiy zhurnal*, **29**, 6, 82 (2008).
9. Digman J.M. Personality structure: Emergence of the five-factor model, *An. Rev. of Psychol.*, **41**, 417 (1990).
10. Kulenkova A.A., Pavlenko V.B. Vsaimosvyaz' temperamenta detey pervyih let zhyzni s ih fiziologicheskimi osobennostyami, *Scientific Notes of Taurida National V. I. Vernadsky University. Series: Biology, chemistry*, **26** (65), 2, 107 (2013).
11. Marshall P.J., Bar-Haim Y., Fox N.A., Development of the EEG from 5 months to 4 years of age, *Clinical Neurophysiology*, **113**, 1199 (2002).
12. Stroganova T.A., Orekhova E.V., Posikera I.N., EEG alpha rhythm in infants, *Clinical Neurophysiology*, **110**, 6, 997 (1999).
13. Cuevas K., Raj V., Bell M.A., A frequency band analysis of two year olds' memory processes, *International Journal of Psychophysiology*, **83**, 3, 315 (2012).
14. Gou Z., Choundhury N., Benasich A.A., Resting frontal gamma power at 16, 24 and 36 months predicts individual differences in language and cognition at 4 and 5 years, *Behavioural Brain Research*, **220**, 2, 263 (2011).
15. Marshall P.J., Fox N.A., The Bucharest Early Intervention Project core group. A comparison of the electroencephalogram between institutionalized and community children in Romania, *Journal of Cognitive Neuroscience*, **16**, 8, 1327 (2004).
16. McLaughlin K.A., Fox N.A., Zeanah C.H., Sheridan M.A., Marshall P., Nelson C.A., Delayed maturation in brain electrical activity partially explains the association between early environmental deprivation and symptoms of attention-deficit/hyperactivity disorder, *Biological Psychiatry*, **68**, 4, 336, (2010).
17. Pavlenko O.M., Vykorystovuvannya harakteryistik EEG dlya ob'ektyvnoho vyznachennya rivnya tryvogoyi i strahu y klientiv psyhologichnogo konsul'tuvannya, *Aktual'ni problemy psyhologii*, **5**, 10, 175 (2010).
18. Benasich A.A., Gou Z., Choundhury N., Harris K.D., Early cognitive and language skills are linked to resting frontal gamma power across the first 3 years, *Behav. Brain. Res.*, **195** (2), 215 (2008).
19. Alieva T.A., Eysmont E.V., Pavlenko V.B., Otrazhenie vosproizvedeniya emotsional'nyh perezhivaniy v patterne EEG u detey 10-12 let, *Neurophysiology*, **43**, 4, 380 (2011).

Поступила в редакцию 17.10.2014 г.

**УДК 618.177-089.888.11**

## **ДИСКУССИОННЫЕ ВОПРОСЫ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МАТКИ У ЧЕЛОВЕКА**

*Лившиц И.В.*

*ГУ «Крымский медицинский университет им. С.И.Георгиевского», Симферополь, Россия  
E-mail: ilivshyts@rambler.ru*

Инновационное оперативное вмешательство трансплантации матки позволяет в сочетании с методикой экстракорпорального оплодотворения достичь наступления беременности и рождения ребенка женщинам с абсолютной маточной формой бесплодия. Однако с целью реализации этого терапевтического подхода требуется предварительный тщательный отбор пациенток для подобного хирургического лечения, подготовка специалистов по репродуктивной медицине, подбор доноров матки.

**Ключевые слова:** трансплантация матки, донор матки, репродуктивная медицина, экстракорпоральное оплодотворение.

Последние несколько десятилетий ознаменовались значительными научными и практическими успехами репродуктивной медицины, среди которых на самом видном месте стоят эндоскопическая хирургия, в том числе с применением робототехники, криобиология половых клеток, а также разработка и внедрение методики экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). Трансплантация ткани яичников успешно применяется в клинической практике для поддержания созревания ооцитов *in vivo* [1]. Трансплантация матки, несмотря на всю очевидную сложность проблемы, с целью лечения маточного фактора бесплодия также оставалась в поле зрения ведущих исследовательских групп и ученых мира. Однако первые сообщения об успешном выполнении операции трансплантации матки у человека появились в литературе в 2002 году [2].

В 2014 г Матсом Бреннстремом (Mats Brännström, 2014) из университета города Гетеборг успешно произвел трансплантацию матки женщине, и благополучном после чего родоразрешении её после этого сложнейшего оперативного вмешательства [3].

Как указано в статье, в 2013 году 35-летней пациентке, страдавшей бесплодием вследствие аплазии матки (синдром Рокитански-Кюстнера-Хаузера), была проведена операция трансплантации матки от живого донора. Донору матки на момент вмешательства был 61 год, в анамнезе у женщины-донора было двое родов. До проведения трансплантации реципиентке предварительно было проведено ЭКО с последующей криоконсервацией 11 эмбрионов.

Послеоперационный период у донора и реципиента протекал без осложнений. У реципиента на 43 день после трансплантации появилась менструальная функция и в дальнейшем продолжительность менструальных циклов составляла от 26 до 36 дней

(медиана 32 дня). Спустя 1 год после трансплантации матки пациентке был проведен перенос одного селективного криооттаянного эмбриона, что привело к наступлению беременности. На протяжении всего гестационного периода беременная получала иммуносупрессивную терапию тремя группами препаратов: такролимус, азатиоприн и кортикостероиды. В ходе беременности трижды появлялись симптомы отторжения трансплантата, которые эффективно купировались усилением дозировки кортикостероидов. Параметры роста внутриутробного плода, кровотоков в маточных артериях и сосудах пуповины регулярно мониторировались и были в пределах нормальных показателей. В 31 неделю 5 дней гестации по данным кардиотокографии у пациентки возникли проявления дистресса плода на фоне преэклампсии. Пациентка была родоразрешена путем операции кесарева сечения живым недоношенным плодом мужского пола массой 1775 г, соответствующей гестационному сроку, по шкале АПГАР 9 -10 баллов.

Несмотря на несомненный успех шведских коллег и актуальности роли трансплантологии в репродуктивной медицине, уже сейчас следует поставить несколько важных дискуссионных вопросов, ряд которых широко обсуждаются в научной литературе [4, 5].

Во-первых, какая группа пациентов будет являться целевой для проведения операций по трансплантации матки? Ответ на этот вопрос не является однозначным. Прежде всего, перспективы для трансплантации матки есть у женщин с маточным фактором бесплодия, у которых нет снижения овариального резерва, что требует тщательного обследования реципиентов на предоперационном этапе. Известно, что в случае проведения ЭКО и эмбриотрансфера шансы на успех существенно снижаются у женщин старше 40 лет. Состояние после экстирпации матки вследствие гинекологических заболеваний (например, миомы матки или рака шейки матки) чаще наблюдается у женщин старшей возрастной группы, имеющих снижение овариального резерва. У этих пациенток также повышена вероятность сопутствующих соматических заболеваний, препятствующих успешному вынашиванию беременности и родам. Пациентки, перенесшие акушерскую гистерэктомию, могут иметь выраженные изменения васкуляризации и архитектоники малого таза, что, видимо, может влиять на ход и успех реконструктивного вмешательства.

На сегодняшний день проблема реабилитации репродуктивной функции у женщин, планирующих трансплантацию матки, не может быть рассмотрена без реализации программы ЭКО. При этом залогом успеха вспомогательных репродуктивных технологий у таких пациенток будут являться и показатели фертильности спермы их партнеров. Проведение ЭКО потенциальными реципиентам матки необходимо проводить до оперативного вмешательства, так как применение иммуносупрессивной терапии может оказывать влияние на стимуляцию суперовуляции и качество ооцитов. Вероятно, что после трансплантации матки могут возникнуть существенные анатомические затруднения при проведении аспирации фолликулов из яичников. Таким образом, трансплантация матки может быть показана женщинам раннего репродуктивного

возраста с врожденными аномалиями матки (аплазия, гипоплазия) или перенесшими гистерэктомию в анамнезе, и имеющих до операции трансплантации матки криоконсервированные эмбрионы.

Требования к донорам матки должны также быть детально обсуждены перед подготовкой к трансплантации. Идеальным донором могут считаться женщины-родственники реципиента. У таких женщин, вследствие общего гена гистосовместимости (human leucocyte antigen, HLA), риск отторжения организмом реципиента трансплантата (матки) должен быть существенно ниже. Однако если речь идет об участии матери реципиента или старшей сестры в качестве донора, то высока вероятность трансплантации постменопаузальной матки, что может лимитировать успех вынашивания беременности. С другой стороны, если родственница репродуктивного возраста, то донор теряет собственный репродуктивный потенциал. Возможна ситуация полного неуспеха трансплантации матки в силу отторжения трансплантата, что приведет к утрате репродуктивной функции у обеих сторон. Кроме того, донор подвергается небезопасному и гораздо более сложному, чем стандартная гистерэктомия, оперативному вмешательству, требующему тщательной скелетонизации сосудистых пучков трансплантируемого органа. С этой точки зрения идеальным донором может считаться только что погибшая женщина репродуктивного возраста, но в этом случае режим ожидания будет растянут во времени, и потребуются прижизненное согласие или согласие родственников на донацию органов.

Важнейшим вопросом должна считаться иммуносупрессивная терапия. Время ее начала и продолжительности, схемы и дозировки препаратов, эмбрио-фетальное влияние подлежат детальному изучению. Перед подготовкой трансплантации матки реципиент должен понимать необходимость проведения иммуносупрессивной терапии, которая может иметь токсические, гипертензивные и теоретически тератогенные побочные эффекты. Проведение иммуносупрессивной терапии не исключает риск отторжения трансплантата и эмбриона. Исследования показывают, что в случае возникновения симптомов отторжения трансплантата дозировку иммуносупрессивных препаратов требуется увеличивать [6].

Процесс трансплантации матки поднимает серьезные этические вопросы, так как отличается от трансплантации других органов тем, что матка не является жизненно важным органом (например, как сердце, почки или легкие). Трансплантация матки должна быть показана исключительно реципиентам с женским (46,XX) генотипом [4]. Восстановление менструальной функции трансплантированной матки не является самоцелью операции трансплантации матки; целью должно являться сохранение и/или восстановление рецептивности эндометрия трансплантат, возможность вынашивания и рождения здорового ребенка. В-целом, трансплантация матки с последующим ЭКО должны рассматриваться как процедура улучшающая качество жизни пациенток. Отсутствие или аномалия матки у пациентки не должны сами по себе рассматриваться как показание для трансплантации матки. Трансплантация должна рассматриваться только как этап подготовки к восстановлению репродуктивной функции методом ЭКО.

Для многих пациентов с маточной формой бесплодия суррогатное материнство по-прежнему является неприемлемой опцией терапии бесплодия, так как в этом случае необходимо привлечение третьей стороны в процессе репродукции. Однако и операция трансплантации также требует участия третьей стороны (донора матки), что для ряда больных останется препятствием к лечению бесплодия. Необходимо учитывать, что пациентки, выбравшие направление трансплантации матки, хотят испытать не только биологическую связь с ребенком, но и физиологические и психологические ощущения во время вынашивания беременности. Не менее важным будет для них являться аспект возможности послеродовой лактации и кормления грудью новорожденного.

Важным аспектом трансплантации матки должна считаться соответствующая подготовка специалистов, работающих в репродуктивной медицине. На сегодняшний день в этом направлении работают лишь 3 - 4 исследовательские группы в мире. Учитывая теоретическую большую глобальную потребность в трансплантации матки, необходима подготовка и координация биологов (эмбриологов), фармакологов, психологов и врачей гинекологов для внедрения методики трансплантации матки в повседневную клиническую практику.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, вышеописанный клинический случай открывает собой новые горизонты терапии бесплодия, связанного с абсолютным маточным фактором. До недавнего времени в таких ситуациях пациентам предлагалась либо вспомогательные репродуктивные технологии с суррогатным материнством или же адопция (усыновление/ удочерение). Для целого ряда больных возможность трансплантации матки с последующим ЭКО и переносом эмбрионов для последующего вынашивания беременности самой пациенткой и лактации в послеродовом периоде будет иметь колоссальное позитивное психологическое значение. Перед проведением инновационного оперативного вмешательства трансплантации матки необходим тщательный отбор пациенток, их обследование и консультирование, соблюдение биоэтических норм.

### Список литературы

1. Oktay K. Ovarian function after transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue. / K. Oktay, G. Karlikaya // *New Engl J Med.* – 2000. – Vol. 342. – P. 1919.
2. Transplantation of the human uterus. / Fageeh W, Raffa H, Jabbad H [et al]. // *Int O Gynecol Obstst.* 2002. – Vol. 76. – P. 245-251
3. Livebirth after uterus transplantation. / Brännström M, Johannesson L, Bokström H, [et al]. // *Lancet* 2014. – [http://doi:10.1016/S0140-6736\(14\)61728-1](http://doi:10.1016/S0140-6736(14)61728-1)
4. Uterine transplantation—a real possibility? / Del Priore G, Saso S, Meslin E.M., Tzakis A, Brännström M, Clarke A.[ et al]. // *The Indianapolis consensus. Hum Reprod.* – 2013. – Vol. 28. – P. 288–291.
5. Lefkowitz, A. The Montreal Criteria for the Ethical Feasibility of Uterine Transplantation. / A. Lefkowitz, M. Edwards, J. Balayla // *Transpl Int.* – 2012. – Vol. 25. – P. 439–447
6. The uterus transplantation trial: 1 year outcome. / Johannesson L, Kvanström N, Mölne J [et al]. // *Fertil Steril* 2014. – <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.09.024>

## CONTROVERSIAL ISSUES OF HUMAN UTERINE TRANSPLANTATION

*Livshyts I.V.*

*Crimean State Medical University named after S.I. Georgievsky, Simferopol, Crimea Republic, Russia  
E-mail: ilivshyts@rambler.ru*

Uterine transplantation is innovative gynecological intervention which can provide opportunity for women with absolute uterine factor of infertility to achieve pregnancy and bear a child. The reported case of the first live birth after uterine transplantation is discussed. Before uterine transplantation in vitro fertilization with cryopreservation of embryos should be done. Despite obvious success of this therapeutic approach several controversial issues such as thorough selection of recipients and donors, influence of immunosuppressive therapy on fetus should be discussed. Training of specialists in reproductive medicine is needed before implementation of this novel technique in daily clinical practice.

**Keywords:** transplantation of the uterus, uterine donor, reproductive medicine, in vitro fertilization.

### References

1. Oktay K and Karlikaya G (2000). Ovarian function after transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue. *New Engl J Med* 342, 1919.
2. Fageeh W, Raffa H, Jabbar H et al. Transplantation of the human uterus. *Int O Gynecol Obstst.* 2002; 76:245-251
3. Brännström M, Johannesson L, Bokström H, et al. Livebirth after uterus transplantation. *Lancet* 2014. [http// doi:10.1016/S0140-6736\(14\)61728-1](http://doi:10.1016/S0140-6736(14)61728-1)
4. Del Priore G, Saso S, Meslin E.M., Tzakis A, Brännström M, Clarke A. et al. Uterine transplantation—a real possibility? The Indianapolis consensus. *Hum Reprod.* 2013; 28: 288–291
5. Lefkowitz, A, Edwards M, and Balayla, J. The Montreal Criteria for the Ethical Feasibility of Uterine Transplantation. *Transpl Int.* 2012; 25: 439–447
6. Johannesson L, Kvanström N, Mölne J et al. The uterus transplantation trial: 1 year outcome. *Fertil Steril* 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.09.024>

*Поступила в редакцию 27.10.2014 г.*

**УДК 661.852:661.848**

## **СОЧЕТАННОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ СВИНЦА И КАДМИЯ НА ОРГАНИЗМ (ОБЗОР ИНОСТРАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ)**

*Островская С.С., Шаторная В.Ф., Колосова И.И.*

*ГУ «Днепропетровская медицинская академия МОЗ Украины», Днепропетровск, Украина  
E-mail: ostr\_2011@mail.ru*

В статье приводится обзор литературы по проблеме сочетанного воздействия свинца и кадмия на организм. В большинстве исследований показано, что их сочетанное влияние, особенно в низких дозах, может привести к кумулятивным или синергическим эффектам, а также к усилению повреждающего действия других компонентов окружающей среды. Однако по некоторым результатам совместное воздействие этих металлов оказывало менее токсический эффект на организм, чем их раздельное влияние, что может быть связано с наличием возможной конкуренции между ними в процессе накопления в органах. Противоречивый характер данных делает обоснованным дальнейшее изучение этой проблемы.

**Ключевые слова:** свинец, кадмий, сочетанные эффекты.

В настоящее время широко изучаются последствия для здоровья сочетанного воздействия химических веществ, которые являются токсичными при их поступлении в организм путем ингаляции или приема пищи. В данной статье приводится обзор литературы по результатам исследований сочетанных эффектов свинца (Pb) и кадмия (Cd) как наиболее распространенных ксенобиотиков.

Известно политропное действие этих металлов на организм, в том числе на сердечно-сосудистую систему. Так, эпидемиологические исследования в США (1999-2008 гг) [1] показали, что сочетанное воздействие Pb и Cd является фактором риска увеличения кровяного давления, причем, Pb являлся фактором химического стресса с повышением диастолического артериального давления.

В серии исследований [2, 3] на 80 крысах линии SD путем перорального введения определяли влияние острого субхронического воздействия смеси ацетата Pb и хлорида Cd в дозах 29, 96, 89, 88 и 269,65 мг / кг массы тела в течение 90 дней. Крысам контрольной группы перорально вводили воду. Кровь брали каждые 30 дней для определения физиологических и биохимических параметров. Показано, что в опытных группах вначале происходило достоверное увеличение, а затем уменьшение лейкоцитов, эритроцитов и концентрации гемоглобина, развивалась микроцитарная гипохромная анемия, постоянное увеличение за всё время эксперимента показателей состояния печени и снижение в сыворотке аланинаминотрансферазы и глутамат-пируват-трансаминазы., повреждение печени и почек в той или иной степени.

Те же авторы [4] изучали влияние смеси субхронических доз ацетата Pb и хлорида Cd на костный метаболизм у крыс. Смесь солей металлов перорально вводили в течение 90 дней: по 29,96 мг/кг массы тела (1 группа), по 89,88 мг/кг веса тела (2 группа) и по 269,65 мг/кг веса тела (3 группа). В сыворотке крови в качестве маркеров костного формирования служили остеокальцин и костно-щелочная фосфатаза, а коллагеновые телопептиды выступали в качестве маркеров костной резорбции. Кальцитонин и паратгормон были использованы в качестве маркеров кальциотропных гормонов. Определяли также концентрацию кальция и фосфора в сыворотке и в моче. Во всех экспериментальных группах результаты показали значительное ( $p < 0,05$  –  $p < 0,01$ ) увеличение концентраций щелочной фосфатазы, коллагеновых телопептидов и паратгормона и уменьшение кальцитонина и остеокальцина. Кроме того, в сыворотке снижалось содержание кальция и фосфора, тогда как в моче – увеличивалось. Полученные данные свидетельствовали о том, что сочетанное воздействие Pb и Cd индуцировало расстройство метаболизма костной ткани, при этом уменьшалось её образование и усиливалась её резорбция. Процесс сопровождался выраженным нарушением гормональной регуляции минерального обмена при наличии дисбаланса кальция и фосфора.

В исследовании [5], проведенном на Нильской тилляпии (рыбы семейства Cichlidae), показано, что содержание сублетальных доз тяжелых металлов, в частности Pb и Cd, в водоемах обладает генотоксическим и цитотоксическим потенциалом, поражая, прежде всего, эритроциты исследованных особей. Выявлена защитная роль витамина E отдельно и в сочетании с селеном (Se) и витаминами A и C, которые добавляли в рацион рыб. Результаты показали, что экспозиция с Pb, Cd, Cu и Zn индуцировала нарушение структуры ядер эритроцитов, что сопровождалось наличием почковидных, лопастных, двулопастных, зубчатых в форме крюка и вакуолизированных ядер. Частоты этих нарушений значительно отличались ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контрольной группой. Максимальное количество нарушений были зафиксированы на 5-й день воздействия смеси металлов. Добавление в рацион рыб только витамина E достоверно ( $p < 0,05$ ) снижало частоту нарушений генома. Однако добавление смеси Se с витаминами A, C и E в рацион рыб приводило к ещё более значительному уменьшению ( $p < 0,05$ ) частоты нарушений генома. Таким образом, на эритроцитах Нильской тилляпии был подтвержден мощный защитный потенциал витамина E и его смеси с Se и с витаминами A и C как антиоксидантов против генотоксичности и цитотоксичности смеси Pb, Cd, Cu и Zn. Кроме того, авторы считают, что полученные тесты могут служить эффективными показателями мониторинга для обнаружения генотоксических и цитотоксических агентов в водной среде.

Некоторые аспекты, касающиеся теории комбинированной токсичности на примере субхронической экспериментальной интоксикации Pb и Cd были продемонстрированы в исследовании [6]. Крысы подвергались внутрибрюшному воздействию (3 раза в неделю суммарно до 20 инъекций) солей этих металлов в дозах, эквивалентных 0,05 LD<sub>50</sub> отдельно или в сочетании. Токсические эффекты были оценены более чем по 40 функциональных, биохимических и

морфометрических индексах. Анализ результатов показал наличие эффекта аддитивности при сочетанном воздействии Pb и Cd.

Показано [7], что сочетанное влияние этих металлов, особенно в низких дозах, может привести не только к кумулятивным или синергическим эффектам, но также к усилению повреждающего действия других компонентов окружающей среды, например, ультрафиолетовых лучей, что имеет место во многих областях промышленной сферы. Авторы этого исследования оценивали взаимодействие ультрафиолетовых лучей длиной 254 нм (УФ-В) с Pb и Cd на культурах *Bacillus cereus* (спорообразующих почвенных бактериях), которые обрабатывали различными концентрациями Pb и Cd с последующим воздействием ультрафиолетового излучения. Фотооблучение и воздействие металлов приводило к повреждению ДНК, цитотоксичности, истощению глутатиона и повышению перекисного окисления липидов в клетках бактерий. При этом только воздействие УФ-В лучей усиливало производство глутатиона. Один Pb не вызывал нарушений в ДНК. Механизм этих сочетанных влияний может заключаться в торможении репарации окислительных повреждений ДНК, так как на снижение мощности этого процесса может влиять увеличение восприимчивости клеток к активным формам кислорода, генерируемых Pb и Cd, о чем свидетельствовало увеличение перекисного окисления липидов в клетках при воздействии УФ-В, Pb и Cd. Данная модель демонстрирует наличие более выраженных мультипликативных эффектов при совместной экспозиции Pb, Cd и УФ-лучей.

Политропный характер токсического воздействия Pb и Cd особенно четко проявляется в почках, печени и органах репродуктивной системы, которые являются, по мнению многих авторов, органами-мишенями для этих металлов.

Так, субхроническое сочетанное воздействие ацетата Pb и хлорида Cd индуцировало окислительный стресс и экспрессию генов металлотионеина (MT) в печени и в почках крыс, что свидетельствует о выраженной опасности для окружающей среды сочетанного воздействия малых доз этих соединений [8]. В этих органах происходило значительное ( $p < 0,01$ ) увеличение уровня малонового диальдегида и снижение уровня восстановленного глутатиона, супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы. При этом мРНК MT значительно увеличилась ( $p < 0,01$ ) в печени и почках крыс. Кроме того, уровни экспрессии мРНК MT-1 и мРНК MT-2 отличались в печени и в почках. Результаты показывают, что MT может быть биохимическим экологическим показателем наличия индуцированного окислительного повреждения печени и почек при воздействии Pb в сочетании с Cd.

Оценивалась [9] цитотоксичность при воздействии ацетата Pb (0,5 и 1 мкг) или ацетата Cd (2,5 и 5 мкг) отдельно, либо в их сочетании на первичные культуры клеток проксимальных канальцев почек крыс. Результаты показали, что сочетание этих двух металлов снижает жизнеспособность проксимальных канальцев и увеличивает количество апоптотических и некротических клеток. Одновременно происходило увеличение внутриклеточных активных форм кислорода, малонового диальдегида и уровня кальция, при снижении митохондриального мембранного потенциала, внутриклеточного окисления и ингибирования Na (+), K (+) и Ca (2 +) -

АТФазной активности. В целом, имелся четко выраженный синергический цитотоксический эффект Pb в сочетании с Cd на проксимальные каналцы. Гибель клеток проксимальных каналцев, индуцированная смесью Pb и Cd реализовывалась через механизм апоптоза и некроза, при этом главным механизмом являлся апоптоз. Изменения внутриклеточных процессов тесно коррелировали с окислительным стрессом и митохондриальной дисфункцией, что способствовало развитию апоптоза.

Однако в целом ряде исследований не подтверждаются синергические эффекты сочетанного воздействия Pb и Cd. В работе [10] изучали состояние окислительно-восстановительного и стероидного метаболизма в печени взрослых самцов крыс при воздействии Pb и Cd либо отдельно, либо в сочетании. Металлы вводили внутрибрюшинно (по 0,025 мг / кг массы тела) в течение 15 дней. Pb и Cd значительно накапливались в печени. Активность ферментов стероидного метаболизма 17-бетагидроксистероидоксидоредуктазы и дифосфатуридин-глюкуронилтрансферазы снижалась, причем первого – на 33%, 38%, и 24%, второго – на 27%, 36% и 25% соответственно при Pb, Cd и при их сочетании (Pb + Cd). Экспозиция с Cd демонстрировала более токсическое воздействие, чем с Pb, в то время как при воздействии этих металлов было выявлено наименьшее снижение активности этих ферментов. Активность ферментов антиоксидантной системы супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионредуктазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы также уменьшалась, а глутатионпероксидазы – увеличилась в митохондриальных и постмитохондриальных фракциях. Уровень перекисного окисления липидов увеличивался, а концентрация клеточного глутатиона уменьшалась. Гистологические исследования печени показали, что только при воздействии Cd наблюдался цитотоксический эффект. Таким образом, сочетанное воздействие Pb и Cd вызывало менее выраженные токсические реакции в печени, чем раздельное действие этих металлов. Авторы полагают, что возможно результатом такой парадоксальной реакции, может быть конкуренция между Pb и Cd в процессе накопления их в печени.

Аналогичные предыдущим данные были получены в исследовании [11], где проверялась причастность индуцированного Pb или Cd окислительного стресса к подавлению стероидогенеза. Было изучено состояние семенников взрослых крыс-самцов, подвергшихся воздействию ацетата Pb и Cd также либо отдельно, либо в сочетании в дозах 0,025 мг / кг массы тела внутрибрюшинно в течение 15 дней. Pb и Cd вызывали увеличение в яичках активных форм кислорода, малоновых диальдегидов и уменьшение активности антиоксидантных ферментов в митохондриальной и / или пост-митохондриальной фракциях: супероксиддисмутазы, каталазы, глюкозо-6 фосфатдегидрогеназы и глутатион-S-трансферазы. Деятельность ферментов стероидогенеза  $3\beta$  и  $17\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназы также значительно уменьшались, что приводило к изменению продукции тестостерона и количества сперматозоидов. Подвижность сперматозоидов и их жизнеспособность также снижались. Экспозиция с Cd показала более токсическое воздействие, чем с Pb, в то время как сочетанное воздействие металлов продемонстрировало наименьшую токсичность.

Эксперименты *in vitro* показали, что витамин С восстанавливает активность стероидных ферментов. Предполагается, что витамин С ингибирует увеличение активных форм кислорода, индуцированное Pb и Cd, которые подавляют стероидогенез в яичках.

Исследовали [12] воздействие Pb и Cd на стероидогенез, антиоксидантные системы яичек и функцию желез у крыс-самцов F<sub>1</sub> поколения, для выяснения биохимических механизмов, участвующих в эндокринных нарушениях. Самкам вводили подкожно по 0,05 мг/кг веса тела 1 раз в день ацетат натрия (контроль), ацетат Pb и ацетат Cd (опытные группы) в течение всего лактационного периода. В потомстве отбирали крыс-самцов, которых умерщвляли на 56 день после рождения для проведения биохимических анализов. В опытных группах наблюдали значительное снижение в деятельности яичек ключевых ферментов стероидогенеза и концентрации сывороточного тестостерона наряду со значительным истощением холестерина, аскорбиновой кислоты и снижением содержания глутатиона, а также деятельности каталазы и супероксиддисмутазы с сопутствующим увеличением уровней тиобарбитуровой кислоты. Содержание спермы и узоры подвижности сперматозоидов были значительно изменены во всех экспериментальных группах, что свидетельствовало о наличии прямого или косвенного сперматоксического эффекта Pb и Cd. Полученные данные свидетельствуют о полифункциональном характере воздействия этих металлов как по отдельности, так и в сочетании, в срыве репродуктивной функции у самцов F<sub>1</sub> поколения.

В этом же эксперименте оценивали также стероидогенез, антиоксидантные системы яичников и функцию желез у крыс-самок F<sub>1</sub> [13]. Деятельность ключевых ферментов стероидогенеза (17β-гидроксистероиддегидрогеназы и 3β-гидроксистероиддегидрогеназы) снижалась во всех опытных группах. Но самое значительное снижение показателей наблюдалось в группе, получавшей Cd, в то время как в группе сочетанного воздействия Pb и Cd наблюдался промежуточный эффект. Уровни эстрадиола и прогестерона в сыворотке крови крыс также значительно изменялись во всех экспериментальных группах, при этом в группе воздействия только Cd было продемонстрировано максимальное снижение этих показателей по сравнению с контрольной группой. Наблюдалось также ингибирующее действие Pb и Cd на уровень белков, регулирующих стероидогенез в яичниках. Кроме того, уменьшалось содержание холестерина в яичниках, при этом в группе воздействия только Cd наблюдалось их максимальное истощение. Активность ферментов антиоксидантной системы, таких как супероксиддисмутаза, каталаза, и глутатионпероксидаза, были резко снижены, при этом значительно повышалась активность реакций перекисного окисления липидов во всех опытных группах. Таким образом, Pb и Cd ингибируют стероидогенез яичников путем нарушения деятельности ферментов стероидогенеза и антиоксидантной системы.

Показано сочетанное воздействие Pb и Cd на антиоксидантный статус гранулёзных клеток в крысиных яичниках [14]. Взрослые самки крыс получали ацетат Pb и Cd по отдельности или совместно в дозах 0,05 мг/кг массы тела ежедневно в течение 15 дней. Оба металла накапливались в яичнике, что вызвало понижение содержания глутатиона и повышение перекисного окисления липидов.

В гранулёзных клетках воздействие Cd и его сочетанное воздействие с Pb вызывало максимальный прирост липопероксидов, активности каталазы, наряду со снижением глутатиона и супероксиддисмутазы. Комбинированное воздействие демонстрировало промежуточный токсический эффект на антиоксидантный статус клеток. Однако воздействие на культуру гранулёзных клеток *in vitro* не показывало существенной разницы в изменении содержания антиоксидантных ферментов, которое во всех трех случаях было, практически, одинаковым. Данные настоящего исследования свидетельствуют о том, что Pb и Cd, действующие по отдельности и в сочетании являются причиной окислительного стресса. Pb и Cd в комбинации не показывали синергического эффекта, что указывает на конкуренцию между ними в силу электронного сродства. Исследование подчеркивает токсичность этих металлов, которые нарушают целостность мембран клеток через активные формы кислорода и, тем самым, повреждают механизмы рецепторного связывания, стероидогенеза и выработку гормонов.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приведенный обзор литературы свидетельствует о том, что сочетанное воздействие Pb и Cd на организм, особенно в низких дозах, имеет четко выраженный кумулятивный или синергический эффект, приводит к нарушению физиологических и биохимических параметров крови, обладает генотоксическим и цитотоксическим потенциалом, вызывает расстройство метаболизма костной ткани, а также приводит к усилению повреждающего действия других компонентов окружающей среды. Политропный характер токсического воздействия Pb и Cd особенно четко проявляется в почках, печени и органах репродуктивной системы, которые являются, по мнению авторов, органами-мишенями для этих металлов. Однако в целом ряде работ показано, что совместное воздействие Pb и Cd, особенно на антиоксидантный статус клеток и стероидогенез в печени, в яичниках и в семенниках оказывает менее токсический эффект, чем их раздельное влияние, что может быть связано, по мнению авторов этих исследований, с наличием возможной конкуренции между металлами в процессе накопления в органах. Противоречивый характер данных делает обоснованным дальнейшее изучение этой проблемы.

### Список литературы

1. Peters J.L. Combined impact of lead, cadmium, polychlorinated biphenyls and non-chemical risk factors on blood pressure in NHANES / J.L. Peters, M. Patricia-Fabian, J.I. Levy // *Environ. Res.* – 2014. – № 132. – P. 93–99.
2. Combined effects of sub-chronic exposure to lead and cadmium on physiological and biochemical indexes of blood in SD rats / G. Yuan, S. Dai, Z. Yin [et. al.] // *Food. Chem. Toxicol.* – 2014. – Vol. 43, № 2. – P. 259–264.
3. Toxicological assessment of combined lead and cadmium: acute and sub-chronic toxicity study in rats / G. Yuan, S. Dai, Z. Yin [et al.] // *Food. Chem. Toxicol.* – 2014. – Vol. 65. – P. 260–268.
4. Effects of mixed subchronic lead acetate and cadmium chloride on bone metabolism in rats / G. Yuan, H. Lu, Z. Yin [et al.] // *Int. J. Clin. Exp. Med.* – 2014 – Vol. 15, № 7. – P. 1378–1385.
5. Harabawy A.S. The role of vitamins A, C, E and selenium as antioxidants against genotoxicity and cytotoxicity of cadmium, copper, lead and zinc on erythrocytes of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* / A.S. Harabawy, Y.Y. Mosleh // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* – 2014. – № 104. – P. 28–35.

6. Some considerations concerning the theory of combined toxicity: a case study of subchronic experimental intoxication with cadmium and lead / A.N. Varaksin, B.A. Katsnelson, V.G. Panov [et al.] // Chem. Toxicol. – 2014. – Vol. 64. – P. 144–156.
7. El-Sonbaty S.M. Combined effect of cadmium, lead and UV rays on Bacillus cereus using comet assay and oxidative stress parameters / S.M. El-Sonbaty, D. E. El-Hadedy // Environ. Sci. Pollut. Res. Int. – 2012. – Vol. 23, № 4. – P. 56–64.
8. Quantification of metallothionein on the liver and kidney of rats by subchronic lead and cadmium in combination / S. Dai, Z. Yin, G. Yuan [et al.] // Environ. Toxicol. Pharmacol. – 2013. – Vol. 36, № 3. – P. 1207–1216.
9. Simultaneous effects of lead and cadmium on primary cultures of rat proximal tubular cells: interaction of apoptosis and oxidative stress / L.Wang, H.Wang, J. Li [et al.] // Arch. Environ. Contam. Toxicol. – 2011. – Vol. 61, № 3. – P. 500–511.
10. Pandya C.D. Lead and cadmium co-exposure mediated toxic insults on hepatic steroid metabolism and antioxidant system of adult male rats / C.D. Pandya, P.P. Pillai, S.S.Gupta // Biol. Trace. Elem. Res. – 2010. – Vol. 134, № 3. – P. 307–317.
11. Effect of lead and cadmium co-exposure on testicular steroid metabolism and antioxidant system of adult male rats / C.Pandya, P. Pillai, L.P. Nampoothiri [et al.] // Andrologia. – 2012. – Vol. 44, № 1. – P. 813–822.
12. Biochemical and reproductive effects of gestational/lactational exposure to lead and cadmium with respect to testicular steroidogenesis, antioxidant system, endogenous sex steroid and cauda-epididymal functions / P. Pillai, C. Pandya, N. Bhatt [et al.] // Andrologia. – 2012. – Vol. 44, № 2. – P. 92–101.
13. Pillai P.P. Biochemical and molecular effects of gestational and lactational coexposure to lead and cadmium on ovarian steroidogenesis are associated with oxidative stress in F1 generation rats / P.P. Pillai, C.D. Pandya, S.S. Gupta // J. Biochem. Mol. Toxicol. – 2010. – Vol. 24, № 6. – P. 384–394.
14. Nampoothiri L.P. Effect of co-exposure to lead and cadmium on antioxidant status in rat ovarian granulosa cells / L.P. Nampoothiri, A. Agarwal, S.S. Gupta // Arch. Toxicol. – 2007. – Vol. 81, № 3. – P. 145–150.

## COMBINED IMPACT OF PLUMBUM AND CADMIUM ON THE ORGANISM (FOREIGNING LITERATURE REVIEW)

*Ostrovskaya S.S., Shatornaya V.F., Kolosova I.I.*

*SI «Dnepropetrovsk medical academy of HM of Ukraine, Dnepropetrovsk, Ukraine  
E-mail: ostr\_2011@mail.ru*

Presence of chemical compounds is a prevalent factor of the surrounding environment. In recent time consequences of a combined impact on health of chemical substances, which are toxic in their entry by inhalation or with food are studied widely.

There is presented literature review of the study results of combined impacts of plumbum (Pb) and cadmium (Cd), the most prevalent xenobiotics, on different organs and tissues. It is shown, that their combined impact, especially in low doses, may lead to cumulative or synergic effects, as well as to amplification of deranging action of other components of the environment, e.g. ultraviolet, which exists in many areas of industrial sphere.

Some aspects concerning the theory of combined toxicity by the example of subchronic experimental intoxication of Pb and Cd were demonstrated over the course of studies on rats. Toxic effects were received on more than 40 functional, biochemical and morphometric indices. Analysis of the results showed existence of mutual addition (additiveness) of effects of combined impacts of Cd and Pb. Their mixed impact causes significant influence on metabolism of bone tissue as well, inducing disorder of bone

metabolism at the expense of osteogenesis decrease and bone resorption increase, eliminating hormonal regulation of mineral exchange, resulted from developing imbalance between calcium and phosphorus.

Combined subchronic effects of impact of Pb acetate and Cd chloride on oxidative stress and expression of metallothionein genes were revealed in the rats' liver and kidneys; this testifies to the danger of small doses of these compounds for surrounding environment, herewith Pb and Cd jointly induce oxidative stress in the tissues of these organs, significantly ( $P < 0,01$ ) increasing level of mallein dialdehyde and decrease of restored glutathione level, superoxide-dismuthase, catalase and glutathione-peroxidase. The conclusion is drawn that these changes may be biochemical ecologic findings of existing induced oxidative derangement of the liver and kidneys in impact of Pb in combination with Cd.

Besides, epidemiologic researches in the USA (1999-2008) showed that combined impact of Pb and Cd is a risk factor of raised blood pressure, in Pb being a marked factor of chemical stress. Histology-pathologic researches showed that in the main, testicles, liver and kidneys are target-organs for Pb and Cd. Many researches testify to poly-functional character of impact of these metals in the derangement of reproductive function, which is especially marked in the combination.

However, in some studies it was shown that combined impact of Pb and Cd in the concentrations of 0,025 mg / kg of body mass introduced intraperitoneally through 15 days caused less toxic effect on metabolism of rats' liver, than in case of their separate impact. In these cases authors of the reviews presented above believe, that relatively low toxic effect may be connected with the presence of possible competition between Pb and Cd in the process of accumulation in the liver.

So, data on the results of combined and separate impact of Pb и Cd on the organism are of contradictory character; this justifies further studying of this problem.

**Keywords:** plumbum, cadmium, effects of combined impact.

#### References

1. Peters J.L., Patricia-Fabian M., Levy J.I., Combined impact of lead, cadmium, polychlorinated biphenyls and non-chemical risk factors on blood pressure in NHANES, *Environ. Res.*, 132, (2014).
2. Yuan G., Dai S., Yin Z., Lu H., Shu Y., Wang C., Combined effects of sub-chronic exposure to lead and cadmium on physiological and biochemical indexes of blood in SD rats, *Food. Chem. Toxicol.*, 43, 2, (2014).
3. Yuan G., Dai S., Yin Z., Lu H., Jia R., Xu J., Song X., Li L., Shu Y., Zhao X., Toxicological assessment of combined lead and cadmium: acute and sub-chronic toxicity study in rats, *Food. Chem. Toxicol.*, 65, (2014).
4. Yuan G., Lu H., Yin Z., Dai S., Jia R., Xu J., Song X., Effects of mixed subchronic lead acetate and cadmium chloride on bone metabolism in rats, *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 15, 7, (2014).
5. Harabawy A.S., Mosleh Y.Y., The role of vitamins A, C, E and selenium as antioxidants against genotoxicity and cytotoxicity of cadmium, copper, lead and zinc on erythrocytes of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 104, (2014).
6. Varaksin A.N., Katsnelson B.A., Panov V.G., Privalova L.I., Kireveva E.P., Valamina I.E., Beresneva O.Y., Some considerations concerning the theory of combined toxicity: a case study of subchronic experimental intoxication with cadmium and lead, *Food.Chem. Toxicol.*, 64, (2014).
7. El-Sonbaty S.M., El-Hadedy D. E., Combined effect of cadmium, lead and UV rays on *Bacillus cereus* using comet assay and oxidative stress parameters, *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 23, 4, (2012).

8. Dai S., Yin Z., Yuan G., Lu H., Jia R., Xu J., Song X., Li L., Shu Y., Liang X., Ye C., Ly C., Zhang W., Quantification of metallothionein on the liver and kidney of rats by subchronic lead and cadmium in combination, *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **36**, 3, (2013).
9. Wang L., Wang H., Liu J., Simultaneous effects of lead and cadmium on primary cultures of rat proximal tubular cells: interaction of apoptosis and oxidative stress, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **61**, 3, (2011).
10. Pandya C.D., Pillai P.P., Gupta S.S., Lead and cadmium co-exposure mediated toxic insults on hepatic steroid metabolism and antioxidant system of adult male rats, *Biol. Trace. Elem. Res.*, **134**, 3, (2010).
11. Pandya C., Pillai P., Nampoothiri L.P., Bhatt N., Gupta S., Effect of lead and cadmium co-exposure on testicular steroid metabolism and antioxidant system of adult male rats, *Andrologia*, **44**, 1, (2012).
12. Pillai P.P., Pandya C.D., Gupta S.S., Biochemical and molecular effects of gestational and lactational coexposure to lead and cadmium on ovarian steroidogenesis are associated with oxidative stress in F1 generation rats, *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, **24**, 6, (2010).
13. Pillai P, Pandya C., Bhatt N., Biochemical and reproductive effects of gestational/lactational exposure to lead and cadmium with respect to testicular steroidogenesis, antioxidant system, endogenous sex steroid and cauda-epididymal functions, *Andrologia*, **44**, 2, (2012).
14. Nampoothiri L.P., Agarwal A., Gupta S.S., Effect of co-exposure to lead and cadmium on antioxidant status in rat ovarian granulosa cells, *Arch. Toxicol.*, **81**, 3, (2007).

*Поступила в редакцию 15.10.2014 г.*

УДК 543.635.24:616.15-006

## ВЭЖХ-СПЕКТРЫ СВОБОДНЫХ ОЛИГОСАХАРИДОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ ПРИ ОСТРЫХ ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

*Письменецкая И.Ю.<sup>1</sup>, Баттерс Т.Д.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>ГУ «Днепропетровская медицинская академия», Днепропетровск, Украина

<sup>2</sup>Институт гликобиологии Оксфордского университета, Оксфорд, Великобритания

E-mail: ip01589@gmail.com

Статья посвящена исследованию свободных олигосахаридов – аналогов гликанов гликоконъюгатов – плазмы крови больных острыми онкогематологическими заболеваниями. (острый лимфобластный лейкоз, острый миелолейкоз, миелодиспластический синдром с избытком бластов) Показано, что свободные олигосахариды плазмы при этих заболеваниях содержат как нейтральную, так и заряженную фракции. Нейтральная фракция по сравнению с нормой или со свободными олигосахаридами плазмы при хронических миелолиферативных заболеваниях значительно редуцирована, что свидетельствует о резком нарушении протеостаза клеток крови. Спектр заряженной фракции похож на таковой при хронических миелолиферативных заболеваниях. Его основные пики представлены двухантными комплексными N-гликанами с одним или двумя остатками сиаловых кислот. Однако, минорные компоненты этой фракции, характерные для хронических состояний, в данном случае полностью отсутствуют. Присутствие двухантного комплексного N-гликана с одним остатком сиаловой кислоты является отличительной чертой хроматографических спектров свободных олигосахаридов плазмы как при хронических, так и при острых онкогематологических заболеваниях.

**Ключевые слова:** свободные олигосахариды, ВЭЖХ-спектры гликанов, плазма крови человека, острые онкогематологические заболевания.

### ВВЕДЕНИЕ

Многообразные процессы синтеза и распада гликоконъюгатов сопровождаются появлением не связанных с полипептидной цепью или липидной молекулой углеводных компонентов – структурных аналогов гликанов гликопротеинов или гликолипидов. Эти углеводные компоненты, которые называются свободными олигосахаридами, могут быть предшественниками углеводной части гликоконъюгатов, как например, в случае начальных этапов N-гликозилирования в эндоплазматическом ретикулуме [1]. Также к свободным олигосахаридам относятся продукты деградации вновь синтезируемых гликопротеинов, которые не прошли клеточный контроль фолдинга [2], и зрелых гликоконъюгатов в ходе их обновления [3]. Каждый этап появления свободных олигосахаридов характеризуется своим набором гликанов с четко выраженными структурами. Поэтому свободные олигосахариды, которые являются результатом функционирования эндоплазматического ретикулума, отражают его состояние, а те гликаны, которые появляются при деградации гликоконъюгатов в лизосомах, говорят о процессах, происходящих в этих органеллах.

Аберрантные (неправильно свернутые, с нарушенным гликозилированием или аномальной сборкой субъединиц) белки, возникающие в процессе синтеза, разрушаются путем ассоциированной с эндоплазматическим ретикуломом деградации (ERAD - endoplasmic-reticulum-associated protein degradation) [4], что позволяет клетке поддерживать протеостаз и защищает организм в целом от появления таких белков в зонах функционального действия. При нарушении протеостаза эндоплазматического ретикулома в клетке запускаются процессы его восстановления через усиление распада аберрантных белков путем активизации ассоциированной с эндоплазматическим ретикуломом деградации [5]. Если же этот путь не дает результата, включаются механизмы «предупреждения об опасности», а потом и гибели клетки [6]. Каскад таких реакций на измененный протеостаз называется реакцией несвернутых белков (UPR-unfolded protein response). Очевидно, что стресс эндоплазматического ретикулома не может не отразиться на процессах гликозилирования и особенностях синтеза свободных олигосахаридов.

Одним из проявлений стресса другой органеллы клетки, связанной с появлением свободных олигосахаридов, лизосомы, является изменение проницаемости ее мембраны, в частности, для гликанов. Молекулярные механизмы ответа клетки и отдельных ее органелл на разнообразные стрессовые факторы находятся в стадии активного изучения, т.к. понимание этих механизмов не только позволяет разобраться в тончайших деталях различных заболеваний, но и предложить новые подходы к их лечению [7].

В предшествующих исследованиях авторов были получены ВЭЖХ-спектры гликанов плазмы крови практически здоровых доноров и больных хроническими миелопролиферативными заболеваниями [8–10]. Целью данной работы было исследование свободных олигосахаридов плазмы крови больных острыми онкогематологическими заболеваниями – острым лимфобластным лейкозом, острым миеломонолейкозом, миелодиспластическим синдромом с избытком бластов.

Острые лейкозы – это гетерогенная группа клональных опухолевых заболеваний системы крови, возникающих в результате мутации и последующих структурных изменений в геноме гемопоэтических клеток-предшественников. Заболевания характеризуются вытеснением нормальных элементов морфологически незрелыми злокачественными кроветворными клетками и инфильтрацией ими различных тканей и органов [11].

Миелодиспластический синдром – это также клональное заболевание, связанное с поражением гемопоэтической стволовой клетки. Данный синдром сопровождается дисплазией и неэффективным гемопоэзом, который затрагивает клетки одной или нескольких линий миелопоэза. Количество миелобластов повышенное, но не достигает 20%, которые являются пороговыми для острых миелоидных лейкозов [12].

Исследования последних лет показали, что при острых лейкозах активируются реакции несвернутых белков [13, 14]. Поэтому было интересно посмотреть, отражается ли это на спектре свободных олигосахаридов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Плазма крови пациентов с диагностированными острыми (острый лимфобластный лейкоз, n=2; острый миеломонолейкоз, n=2; миелодиспластический синдром с избытком бластов, n=2) и хроническими (сублейкемический миелоз, n=10; истинная полицитемия, n=10) онкогематологическими заболеваниями, а также плазма крови практически здоровых доноров (n=10) были отобраны с согласия всех групп и в соответствии с требованиями этического комитета в клинике ГУ «Днепропетровская медицинская академия». Возраст относительно здоровых доноров соответствовал возрастной категории больных исследуемых группы и составлял от 40 до 65 лет.

Для нормальнофазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии использовали реактивы фирмы VWR International, остальные химические реагенты были получены от фирмы Sigma-Aldrich.

**Удаление белков плазмы.** Депротеинизацию нативной плазмы крови проводили путем осаждения белков 10% трихлоруксусной кислотой с последующим центрифугированием в течение 10 минут при 3000 оборотах в минуту [15]. Остатки белков удаляли с помощью фильтра с гидрофильной полифлуороэтиленовой мембраной (Millex-LN, 0.45  $\mu\text{m}$ , Millipore Corp., США), в соответствии с опубликованной методикой [16].

**Удаление глюкозы.** Моносахариды из плазмы после депротеинизации удаляли адсорбционной хроматографией на пористом графите с использованием колонки PGC (Thermo Electron Corp., Runcorn, UK) на 1 мл (25 мг/мл), как описано в работе [16].

**Маркирование олигосахаридов флуоресцентной меткой.** Свободные олигосахариды метили 2-аминобензойной (антраниловой) кислотой (Sigma – Poole, Dorset, UK) в соответствии с методикой, приведенной в статье Neville D.C.A. et.al. [17]. Меченные гликаны очищали твердофазной экстракцией на колонках Speed SPE Cartridges Amide-2, (Applied Separations, США) [16].

**Разделение олигосахаридов на фракции.** Меченные антраниловой кислотой гликаны разделяли на нейтральные и заряженные (кислые) ионообменной хроматографией на QAE- Сефадексе (Q25-120) после нанесения их на колонку и промывки водой путем элюции нейтральных гликанов уксусной кислотой, а заряженных – ацетатом аммония в соответствии с методикой Neville D.C.A. et.al. [17].

**Нормальнофазовая высокоэффективная хроматография (ВЭЖХ).** Олигосахариды разделяли методом нормальнофазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии на приборе фирмы Waters (Великобритания) с колонкой 4.6x250-mm TSK gel-Amide 80 (Anachem, Luton, Beds, Великобритания) в соответствии с методикой, приведенной в работах Neville D.C.A. et.al. [17, 18]. Пики хроматограмм выражали в глюкозных единицах (ГЕ) путем сравнения с хроматограммой внешнего стандарта – частично гидролизованного декстрана, как описано в статье Neville D.C.A. и др. [17].

**Компьютерная обработка данных.** Для сбора хроматографических данных и их обработки использовали компьютерные программы Waters Millennium, Waters

Empower, Peak Time, Microsoft Office Excel 2003/2007, Microsoft Power Point 2003/2007.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе впервые были получены хроматографические спектры общей, нейтральной и заряженной (кислой) фракций свободных олигосахаридов плазмы крови больных острыми (острый лимфобластный лейкоз, острый миеломонолейкоз, миелодиспластический синдром с избытком бластов) онкогематологическими заболеваниями и проведено их сравнение со спектрами гликанов плазмы относительно здоровых доноров и больных хроническими миелопролиферативными заболеваниями.

Исследовались олигосахариды, состоящие из 4-5 и более остатков моносахаридов, поэтому анализу подвергались хроматограммы на временном отрезке от 20-26 до 44 минут. Нумерация пиков на всех рисунках идентична и соответствует их положению пика на хроматограмме, т.е. времени его удерживания.

При острых онкотрансформациях клеток красного костного мозга хроматографические спектры гликанов плазмы крови, имея индивидуальные особенности, обладали ярко выраженными общими характеристиками. Основу всех спектров общего пула олигосахаридов составляли пики 6, 7, 8, 9 и 10а. При этом первые два пика, 6-й и 7-й, были менее выраженными, а в некоторых образцах 7-й пик практически отсутствовал.

При разделении гликанов на фракции в зависимости от заряда 6-й, 7-й и 8-й пики были представлены нейтральными олигосахаридами, а 10а - кислыми. 9-й пик содержал представителей обеих фракций. Типичный ВЭЖХ-спектр общего пула свободных олигосахаридов плазмы крови больных острыми заболеваниями, а также результат его разделения на 2 фракции в зависимости от заряда (фракцию нейтральных олигосахаридов и фракцию отрицательно заряженных олигосахаридов) представлены на рисунке 1 (I).

В качестве контроля использовали спектры свободных олигосахаридов плазмы крови практически здоровых доноров (рис.1, II). Сравнение с нормой выявило резкую редукцию ВЭЖХ-спектров гликанов плазмы крови больных – исчезновение пиков 1-5 и существенное сокращение пиков 6 и 7. В то же время наблюдалось перераспределение гликанов в пользу 8-го, 9-го и 10-го пиков, которые в норме в общем пуле представлены минорными компонентами. Пофракционный анализ показал, что наибольшей редукции и перераспределению подверглись гликаны нейтральной фракции, которые характеризуют состояние эндоплазматического ретикулума. Исчезновение свободных олигосахаридов в этой фракции отражает состояние стресса эндоплазматического ретикулума, в результате чего происходит снижение процессов ассоциированной с эндоплазматическим ретикуломом деградации вновь синтезируемых белков. Это свидетельствует о том, что при острых онкогематологических заболеваниях подавлен синтез белков, т.е. нарушен протеостаз в клетках крови.

Сравнение изучаемых спектров с соответствующими хроматограммами гликанов при хронических миелопролиферативных заболеваниях (рис.1, III)

показало, что главное отличие спектров свободных олигосахаридов плазмы крови при онкотрансформациях – наличие пика 9 во фракции заряженных гликанов – сохраняется и в данном случае.

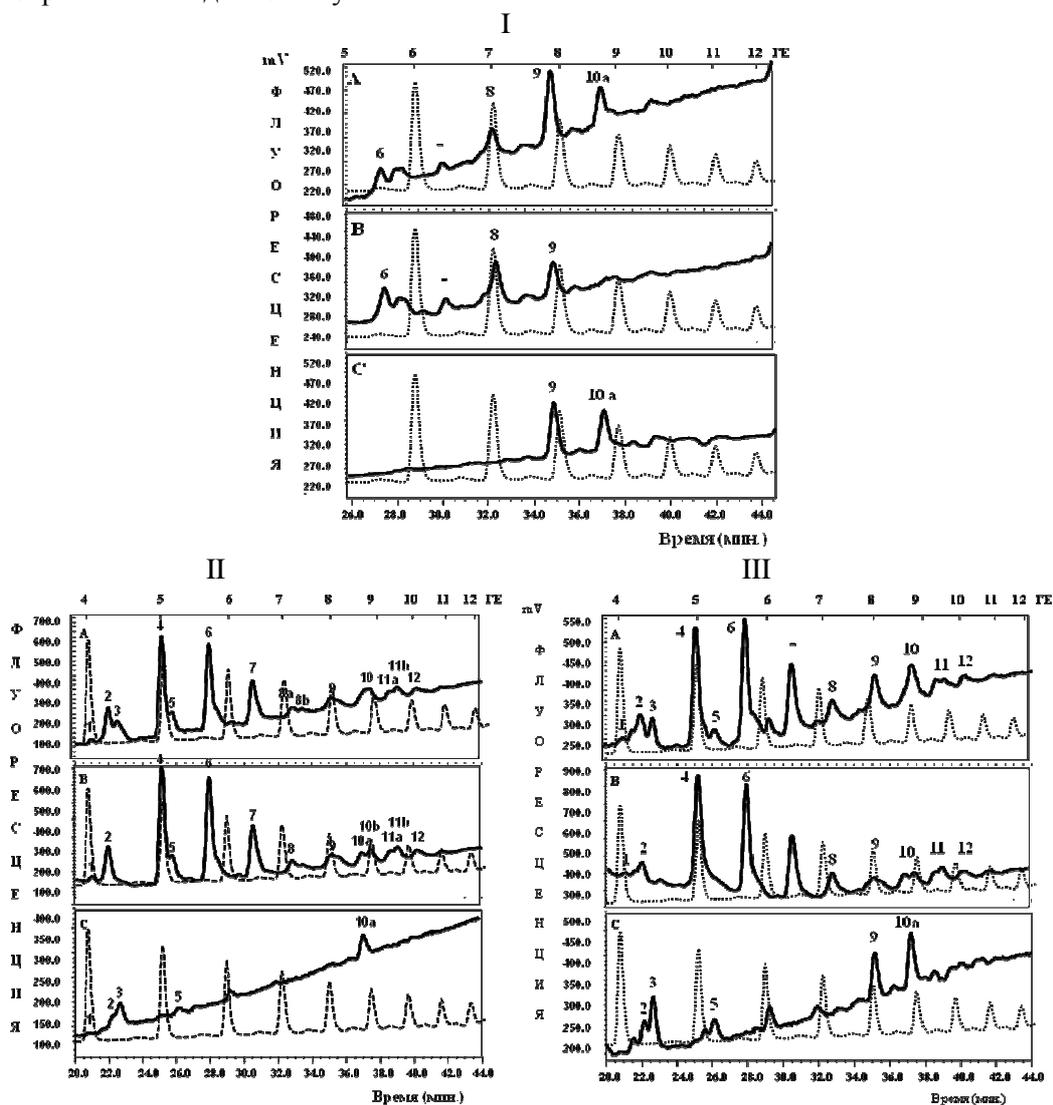


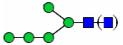
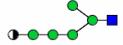
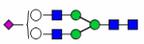
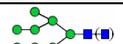
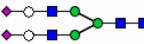
Рис.1. ВЭЖХ-спектры отдельных групп (А – общая фракция, В – нейтральная фракция, С – заряженная фракция) свободных олигосахаридов плазмы крови: I – больных острыми онкогематологическими заболеваниями; II – практически здоровых доноров; III – больных с хроническими онкологическими трансформациями.

*Примечание:* Пунктиром обозначены спектры внешнего стандарта – частично гидролизованного декстрана.

Однако, общее снижение синтеза белка при острых заболеваниях приводит к полному исчезновению минорных компонентов заряженной фракции, которые характерны для хронических заболеваний.

В таблице 1 показаны основные возможные структуры гликанов каждого пика исследуемых ВЭЖХ-спектров. Выбор структур нейтральной и заряженной фракций был обоснован в предыдущей работе авторов [19] и опирался на анализ внутриклеточных свободных олигосахаридов и соответствующих электронных баз данных о гликанах гликопротеинов.

**Таблица 1.**  
**Характеристика пиков ВЭЖХ-спектров свободных олигосахаридов плазмы крови при острых онкогематологических заболеваниях**

№ пика	ГЕ	Нейтральные	Заряженные
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	 	 
■-N-ацетилглюкозамин, ●-манноза, ◆-сиаловая кислота, ●-глюкоза, ○-галактоза			

Анализ пиков нейтральной фракции свидетельствует, что она представлена двухантенными и трехантенными полиманнозными N-гликанами с остатками глюкозы или без них, с одним или двумя остатками N- ацетилглюкозамина. В главных пиках – 8-м (7,08 ГЕ) и 9-м(7,85 ГЕ) – содержится 6-7 маннозных остатков. 5 маннозных остатков содержится в минорных пиках фракции.

9-й и 10-й пики заряженной фракции представлены двухантенными комплексными N-гликанами с одним или двумя остатками сиаловых кислот, соответственно. Таким образом, комплексные N-гликаны с одним остатком сиаловой кислоты являются маркерными как для изученных хронических, так и для острых онкогематологических состояний.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Впервые были получены ВЭЖХ-спектры общего пула, нейтральной и заряженной фракций свободных олигосахаридов плазмы крови больных острыми (острый

лимфобластный лейкоз, острый миеломонолейкоз, миелодиспластический синдром с избытком бластов) онкогематологическими заболеваниями и проведено их сравнение со спектрами гликанов плазмы практически здоровых доноров и больных хроническими миелопролиферативными заболеваниями.

2. Показано, что нейтральная фракция свободных олигосахаридов плазмы крови исследуемых больных сильно редуцирована по сравнению с нормой и типичными спектрами при хронических миелопролиферативных заболеваниях (сублейкемический миелоз и истинная полицитемия). Эта фракция представлена двухантенными и трехантенными полиманнозными N-гликанами с 5-7 остатками маннозы. Главные пики фракции содержат полиманнозные N-гликаны с 6-7 остатками маннозы.
3. Спектр заряженной фракции близок к спектру при хронических миелопролиферативных заболеваниях. Его основные пики представлены двухантенными комплексными N-гликанами с одним или двумя остатками сиаловых кислот, первый из которых отсутствует в спектре гликанов практически здоровых доноров. В случае острых состояний минорные компоненты, очень характерные для хронических заболеваний, не были выявлены.
4. Полученные результаты свидетельствуют о нарушении протеостаза клеток крови при острых онкогематологических заболеваниях, что отражается в исчезновении большинства пиков спектра нейтральной фракции, очевидно, из-за резкого подавления связанной с эндоплазматическим ретикуломом деградации вновь синтезируемых белков.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Образцы крови больных были любезно предоставлены для анализа врачом ГУ «Городская многопрофильная клиническая больница» Т.П.Николаенко-Камышовой. Работа была выполнена при поддержке международных грантов International Union Against Cancer ICREET (ICR/09/044), EMBO (ASTF201-2010) и Института гликобиологии Оксфордского университета (г.Оксфорд, Великобритания) в лаборатории доктора Терри Д. Баттерса (Terry D. Butters).

#### Список литературы

1. Anelli T. Protein quality control in the pathway early secretory / T.Anelli, R.Sitia // The EMBO Journal. – 2008. – Vol.27. – P.315–327.
2. Braakman I. Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum / I.Braakman, N.J. Bulleid // Annu. Rev. Biochem. – 2011. – Vol.80 – P.71–99.
3. Winchester B. Lysosomal metabolism of glycoproteins/ B.Winchester //Glycobiology. – 2005. – Vol.15, №6. – P.1R –15R.
4. 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.
5. Schroder M. ER stress and the unfolded protein response/ M.Schroder, R.J. Kaufman // Mutat Res. – 2005. –Vol.569. –P.29–63.
6. Kim R. Role of the unfolded protein response in cell death/ R. Kim, M. Emi, K. Tanabe, S. Murakami // Apoptosis. – 2006. – Vol.11. – P.5–13.

7. Ma Y. The role of the unfolded protein response in tumour development: friend or foe? / Y.Ma, L.M. Hendershot // *Nat Rev Cancer*. – 2004. – Vol.4. – P.966–977.
8. 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.
9. Письменецька І.Ю. Свободные олигосахариды плазмы крови больных истинной полицитемией: характеристика общего спектра / І.Ю. Письменецька // *Журнал Гродненского государственного медицинского университета*. – 2013. – Т.1 (41). – С.45–49.
10. Письменецька І.Ю. Изменение хроматографических спектров свободных олигосахаридов плазмы крови при сублейкемическом миелозе / І.Ю. Письменецька, Т.Д. Баттерс // *Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия»*. – 2013. – Т.26 (65), №1. – С.153–160.
11. Менткевич Г.Л. Лейкозы у детей / Г.Л. Менткевич, С.А.Маякова – *Практическая медицина*, М., 2009. – 384 с.
12. Глузман Д.Ф. Опухоли кроветворной и лимфоидной тканей (цитоморфология, иммуноцитохимия, алгоритмы диагностики) / Глузман Д.Ф., Складенко Л.М., Надгорная В.А. – ДИА, Киев, 2008. – 196 с.
13. Tanimura A. Activation of the unfolded protein response in primary acute myeloid leukemia cells / A.Tanimura, T.Yujiri, Y.Tanaka [et al.] // *Int J Hematol*. – 2011. – Vol.94, №3. – P.300–302.
14. Schardt J.A. Activation of the unfolded protein response in human acute myeloid leukemia / J.A.Schardt, B.U.Mueller, T.Pabst // *Meth. Enzymol*. – 2011. – Vol.489. – P.227–243.
15. Письменецька І.Ю. Вплив іммобілізації та депротеїнізації плазми крові на спектр вільних олігосахаридів. / І.Ю. Письменецька // *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія «Біологія»* – 2012. – №60. – С.27–29.
16. 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.
17. 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. – Vol.331. – P.275–282.
18. 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.
19. Письменецька І.Ю. Прогнозування структур 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), №3. – С.158–164.

## HPLC-PROFILES OF PLASMA FREE OLIGOSACCHARIDES IN ACUTE HEMATOLOGIC MALIGNANCIES

*Pismenetskaya I.U.<sup>1</sup>, Butters T.D.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>*SI «Dnipropetrovsk Medical Academy», Dnipropetrovsk, Ukraine*

<sup>2</sup>*Oxford Glycobiology Institute, Oxford University, Oxford, UK*

*E-mail: ip01589@gmail.com*

The article is devoted to a study of blood plasma free oligosaccharides of patients with acute haematological malignancies (acute lymphatic leukemia, acute myelomonocytic leukemia, acute phase of myelodysplastic syndrome).

Plasma samples of healthy people and patients with leukemia were collected in Dnipropetrovsk Medical Academy in accordance with the requirements of the Ethics

Committee. Native plasma was precipitated with trichloroacetic acid for its deproteinization, partial sterilization and stabilization. The purification of free glycans comprised filtration through a syringe with a Millipore filter to take proteins away and porous graphitized carbon column chromatography to remove monosaccharides. Free oligosaccharides were analysed using high-performance liquid chromatography after anthranilic acid labelling. The labelled sugars were separated into neutral and charged oligosaccharides with QAE Sephadex chromatography.

For the first time we obtained HPLC-profiles of a total pool, neutral and charged fractions of blood plasma free oligosaccharides of patients with acute haematological malignancies (acute lymphatic leukemia, acute myelomonocytic leukemia, acute phase of myelodysplastic syndrome) and compared them with HPLC-profiles of plasma glycans of practically healthy donors and patients with chronic myeloproliferative diseases (subleukemic myelosis and polycythaemia vera). The neutral fraction of the patients' plasma glycans was shown to be strongly reduced compared with the normal and typical HPLC-profiles in chronic myeloproliferative disorders. This fraction is represented by bi- and tri-antennary high mannose type N-glycans with 5-7 mannose residues. Main peaks of the fraction contained N-glycans with 6-7 mannose residues. The profiles of the charged fraction were very similar to those in chronic myeloproliferative disorders. Their main peaks were most likely represented by bi-antennary complex N-glycans with one or two sialic acid residues, the first of which were not found in norm. Thus, bi-antennary complex N-glycans with one sialic acid residue was a marker both for acute and chronic haematological malignancies.

The results obtained indicated proteostasis disruption in blood cells in acute hematologic malignancies, which was reflected in the disappearance of most of the peaks in the HPLC-profiles of neutral fraction, obviously, because of the sharp suppression of the endoplasmic reticulum-associated degradation of newly synthesized proteins.

**Keywords:** free oligosaccharides, HPLC-profiles of glycans, human blood plasma, acute hematologic malignancies.

#### References

1. Anelli T. and Sitia R., Protein quality control in the early secretory pathway, *The EMBO Journal*, **27**, 315 (2008).
2. Braakman I. and Bulleid N.J., Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum, *Annu. Rev. Biochem.*, **80**, 71 (2011).
3. Winchester B., Lysosomal metabolism of glycoproteins, *Glycobiology*, **15**, **6**, 1R (2005).
4. Benyair R., Ron E. and Lederkremer G.Z., Protein quality control, retention, and degradation at the endoplasmic reticulum, *Int Rev Cell Mol Biol.*, **292**, 197(2011).
5. Schroder M. and Kaufman R.J., ER stress and the unfolded protein response, *Mutat Res*, **569**, 29 (2005).
6. Kim R., Emi M., Tanabe K. and Murakami S., Role of the unfolded protein response in cell death, *Apoptosis*, **11**, 5 (2006).
7. Ma Y. and Hendershot L.M., The role of the unfolded protein response in tumour development: friend or foe? *Nat Rev Cancer*, **4**, 966 (2004).
8. Pismenetskaya I.U. and Butters T.D., Blood plasma free oligosaccharides of practically healthy volunteers, *Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University, Series: Biology, chemistry*, **25**, (64), **1**, 182 (2012).
9. Pismenetskaya I.U., Blood plasma free oligosaccharides of patients with polycythaemia vera (I. Characteristics of the whole spectra), *Journal of the Grodno State Medical University*, **1**, **41**, 45 (2013).

10. Pismenetskaya I.U. and Butters T.D., Chromatographic profile changes of plasma free oligosaccharides in Subleukemic myelosis, *Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University, Series: Biology, chemistry*, **26**, (65), 1, 153 (2013).
11. Mentkevich G.L. and Mayakova S.A., Children's leukemia, 384 p. (Practical Medicine, Moskow, 2009.)
12. Gluzman D.F., Sklyarenko L.M. and Nagornaya V.A., Tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (Cytomorphology, Immunocytochemistry, Diagnostics Algorithms), 196 p. (DIA, Kyiv, 2008).
13. Tanimura A., Yujiri T., Tanaka Y., Tanaka M., Mitani N., Nakamura Y., Ariyoshi K. and Tanizawa Y., Activation of the unfolded protein response in primary acute myeloid leukemia cells, *Int J Hematol.*, **94**, 3, 300 (2011).
14. Schardt J.A., Mueller B.U. and Pabst T., Activation of the unfolded protein response in human acute myeloid leukemia, *Meth. Enzymol.*, **489**, 227 (2011).
15. Pismenetska I.U., Influence of blood plasma immobilization and deproteinization on the spectrum of free oligosaccharides, *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv, Series Biology*, **60**, 27 (2012).
16. Alonzi D.S., Neville D.C., Lachman R.H., Dwek R.A. and Butters T.D., Glucosylated free oligosaccharides are biomarkers of endoplasmic- reticulum alpha-glucosidase inhibition, *Biochem J.*, **409**, 2, 571 (2008).
17. Neville D.C., Coquard V., Priestman D.A., te Vruchte D.J., Sillence D.J., Dwek R.A., Platt F.M. and Butters T.D., Analysis of fluorescently labelled glycosphingolipid-derived oligosaccharides following ceramide glycanase digestion and anthranilic acid labelling, *Anal Biochem*, **331**, 275 (2004).
18. Neville D.C., Dwek R.A. and Butters T.D. Development of a single column method for the separation of lipid- and protein-derived oligosaccharides, *J. Proteome Res.*, **8**, 681 (2009).
19. Pismenetskaya I.U. and Butters T.D., A structure prediction of blood plasma free oligosaccharides of practically healthy donors, *Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University, Series: Biology, chemistry*, **25**, (64), 3, 158 (2012).

Поступила в редакцию 27.10.2014 г.

УДК 582.42.47 (477.51)

## ЦЕНОТИЧНЕ ТА ФЛОРИСТИЧНЕ РІЗНОМАНІТТЯ ПРИРОДНИХ ТЕРИТОРІЙ В МЕЖАХ МІСЬКИХ ЗОН ЧЕРНІГІВСЬКОГО ПОЛІССЯ

*Потоцька С.О.*

*Чернігівський національний педагогічний університет імені Т.Г. Шевченка, Чернігів,  
Україна  
E-mail: sav-14@mail.ru*

На основі проведених досліджень, слід зазначити ряд особливостей, які характерні для природних територій в межах міських зон Чернігівського Полісся. З'ясовано, що природна дендрофлора міста Чернігова налічує 63 види, 39 родів, 24 родини. Лісова рослинність за домінантною класифікацією представлена 72 асоціацією, що належать до 14 формацій. Їх поширення і склад дендрофлори обумовлений едафо-кліматичними та орографічними особливостями міських зон. Формації широколистяних лісів та їх похідних (*Querceta roboris*, *Tilieta cordatae*, *Fraxineta excelsioris*, *Carpineta betulae*) поширені на плакорах та характеризуються найбільшою різноманітністю видів деревного і чагарникового ярусів. До заплав річок приурочені формації *Populeta tremulae*, *Populeta albae*, *Populeta nigrae* і *Saliceta albae*, до прітеррасних ділянок – угруповання *Alneta glutinosae*, до надзаплавних терасах – *Pineta sylvestris*.

**Ключові слова:** фіторізноманіття, дендрофлора, Чернігівське Полісся, місто Чернігів, міські зони.

### ВСТУП

Зелені насадження як невід'ємні компоненти урбосистем виконують важливу соціально-екологічну роль у підтриманні балансу середовища. До їх складу входять різні типи із різноманітною дендрофлорою, які поєднуються із природними масивами. Саме такими є зелені міські зони Чернігівського Полісся, зокрема і міста Чернігова, які включають природні лісові ділянки річкових заплав, терас та плакорів, лісопарки, парки, сквери, квартальні та вуличні насадження. Міська система виступає як своєрідне поєднання різних ландшафтів, складових середовища та екологічних умов.

Чернігівське Полісся має характер акумулятивної низовинної рівнини, більша частина якої в сучасному рельєфі відповідає Придніпровській низовині. В загальному плані Чернігівське Полісся являє собою територію зі слабо-розчленованими заболоченими і розчленованими еродованими горбисто-хвилястими залісеними та безлісними моренними, моренно-зандровими, зандровими міжрічковими і алювіальними терасовими рівнинами, розділеними сучасними річковими і давніми воднольодовиковими долинами [1]. Згідно з фізико-географічним районуванням (Національний атлас України, 2009) Чернігів знаходиться в регіоні Чернігівського Полісся, (координати 48°37'N22°18'E), його площа становить 78 км<sup>2</sup> [2]. Загальна площа земель, що знаходяться в адміністративних межах міста складає 7132 гектари, площа зелених насаджень міста Чернігова (станом на 01.01.2014 р.) становить 3100 га [3]. У кліматичному

відношенні територія регіону досліджень належить до північно-західної підобласті Атлантично-континентальної лісової кліматичної області. Більшу частину території міста Чернігова займають дерново-підзолисті супіскові ґрунти на лесових породах.

Географічне положення, природно-екологічні умови міста Чернігова та його околиць сприяють формуванню мозаїчного рослинного покриву території досліджень та обумовлюють значною мірою різноманітність рослинних угруповань за участю видів природної дендрофлори [4].

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

В основу роботи покладені матеріали польових досліджень, проведених автором протягом 2009 – 2014 рр. на території зеленої зони міста Чернігова. Програма досліджень включала аналіз дендрологічного складу, структури, еколого-географічних, біоморфологічних та геоботанічних особливостей видів природної дендрофлори. Для визначення еколого-ценотичної приуроченості видів природної дендрофлори здійснено геоботанічні обстеження територій зелених насаджень Чернігова; геоботанічні описи проводили за загальноприйнятими методиками [5]. Класифікації осередків природної рослинності здійснено на домінантній основі.

Об'єкт дослідження – ценотичне та флористичне різноманіття природних територій в межах міських зон Чернігівського Полісся (на прикладі міста Чернігова). Предмет дослідження – систематична структура, еколого-ценотичні, географічні та соціологічні особливості природної дендрофлори міста Чернігова.

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

За результатами проведених досліджень природна дендрофлора міста Чернігова налічує 63 види, 39 родів, з 24 родин та 2 відділів (таблиця 1).

Відділ *Pinophyta* представлений 2 родинами, 3 родами та 3 видами – *Pinus sylvestris* L., *Picea abies* (L.) Karst., *Juniperus communis* L.. Відділ *Magnoliophyta*, що переважає за кількісними показниками, включає 60 видів, 36 родів та 22 родини. За кількістю видів переважають родини *Salicaceae* (13 видів) та *Rosaceae* (12). Інші, включають від 1 до 4 видів. За кількістю родів переважає родина *Rosaceae* (7). Високі рангові позиції родин *Salicaceae* і *Rosaceae* узгоджуються із закономірностями, властивими флорі Українського Полісся (Фіторізноманіття Українського Полісся ..., 2006). Це виявляється також у спектрі провідних родів, у якому для поліської флори бореальний рід *Salix* представлений 16 видами, у регіоні досліджень – 10 видами [6].

Загальний розподіл видів природної дендрофлори пов'язаний з найбільшими осередками зеленої міської зони, зокрема з лісопарковими територіями, приміськими лісами уздовж річок та обумовлений едафічним режимом, орографічними особливостями та структурою ценозів .

Складовими сучасного міського ландшафту Чернігова є заплава р. Десни та схили її високого правого берега, лісопарки та урочища – 331,5 га, серед яких "Кордівка" (275 га), "Святе" (44), "Мар'їн гай" (12,5); регіональний ландшафтний парк (далі РЛП) – "Ялівщина" (110 га) [7]. Також, певне місце займають і міські лісові території – площею 448,57 га, з них "Березовий яр" (12,0 га), урочища:

"Кривулівщина" (12,12), "Маліїв яр" (11,7), "Подусівський ліс" (255,0), "Рашевщина" (4,4), території вздовж Київського шосе (30,0 та 120,0) та інші [3].

Особливості поширення лісових ценозів на окремих природних територіях зеленої зони міста Чернігова наведені у таблиці 2. Нижче наведено описи найбільш типових та ряду рідкісних угруповань, вони включають характеристики їх фітоценотичного складу та флористичного ядра.

**Таблиця 1**  
**Систематична структура природної дендрофлори**

№	Родина	Кількість родів	% від загальної кількості родів	Кількість видів	% від загальної кількості видів
1	2	3	4	5	6
Відділ <i>Pinophyta</i>					
1	<i>Pinaceae</i>	2	5,1	2	3,1
2	<i>Cupressaceae</i>	1	2,6	1	1,6
Відділ <i>Magnoliophyta</i>					
3	<i>Aceraceae</i>	1	2,6	3	4,8
4	<i>Apoynaceae</i>	1	2,6	1	1,6
5	<i>Betulaceae</i>	2	5,1	3	4,8
6	<i>Cannabaceae</i>	1	2,6	1	1,6
7	<i>Caprifoliaceae</i>	1	2,6	1	1,6
8	<i>Celastraceae</i>	1	2,6	2	3,1
9	<i>Cistaceae</i>	1	2,6	1	1,6
10	<i>Cornaceae</i>	1	2,6	1	1,6
11	<i>Corylaceae</i>	2	5,1	2	3,1
12	<i>Ericaceae</i>	1	2,6	1	1,6
13	<i>Fabaceae</i>	2	5,1	2	3,1
14	<i>Fagaceae</i>	1	2,6	1	1,6
15	<i>Grossulariaceae</i>	2	5,1	3	4,8
16	<i>Oleaceae</i>	1	2,6	1	1,6
17	<i>Rhamnaceae</i>	2	5,1	2	3,1
18	<i>Rosaceae</i>	8	20,2	12	19,0
19	<i>Salicaceae</i>	2	5,1	13	20,9
20	<i>Sambucaceae</i>	1	2,6	2	3,1
21	<i>Tiliaceae</i>	1	2,6	1	1,6
22	<i>Ulmaceae</i>	1	2,6	4	6,3
23	<i>Vacciniaceae</i>	2	5,1	2	3,1
24	<i>Viburnaceae</i>	1	2,6	1	1,6
	Всього	39	100	63	100

Угруповання формації *Pineta sylvestris* поширені на ділянках борових терас річок Стрижня та Білоусу, частково р. Десни, на дерново–слабопідзолистих піщаних та супіщаних ґрунтах. Тут переважають середньовікові культури ("Ялівщина"), частково старі природні ділянки (урочища: "Святе", "Подусівський ліс").

Таблиця 2

Ценотична та флористична характеристика природної рослинності

Формація	Кількість			Території поширення
	Ас	Видів		
		Д	Ч	
<i>Pineta sylvestris</i>	9	5/3	6/1	ур.: "Подусівський ліс", "Святе"*, "Рашевщина", "Березовий яр", р-н Павлівка, РЛП "Ялівщина"*
<i>Querceta roboris</i>	12	11	7	ур. Кривулівщина, сх. окол. міста, р-ни: Подусівка, Павлівка, Новоселівка
<i>Tilieta cordatae</i>	3	6	7	р-н Новоселівка, сх. окол. міста
<i>Fraxineta excelsioris</i>	6	5/1	6/1	лп. "Кордівка", р-н Подусівка, Павлівка
<i>Carpineta betulae</i>	2	4	5	р-н Новоселівка та сх. окол. міста
<i>Betuleta pendulae</i>	6	6/1	6/1	ур.: "Рашевщина", "Березовий яр", "Подусівський ліс", "Кривулівщина", півн. окол. міста
<i>Populeta tremulae</i>	9	6	5/1	ур. "Мар'їн гай", лп. "Кордівка", запл. пр. б. р. Десни
<i>Populeta tremulae</i>	9	6	5/1	ур. "Мар'їн гай", лп. "Кордівка", запл. пр. б. р. Десни
<i>Populeta albae</i>	2	3	6	лп. "Кордівка", запл. пр. б. р. Десни півд. окол. міста
<i>Populeta nigrae</i>	3	3	6/1	лп. "Кордівка", ур. "Мар'їн гай", запл. пр. б. Десни, півд. окол. міста
<i>Robinieta pseudoacaciae</i>	3	3/1	5	ур.: "Рашевщина», "Березовий яр", "Кривулівщина", півн. окол. міста
<i>Robinieta pseudoacaciae</i>	3	3/1	5	ур.: "Рашевщина», "Березовий яр", "Кривулівщина", півн. окол. міста
<i>Alneta glutinosae</i>	5	5	5	лп. "Кордівка", р-ни: Подусівка, Павлівка, запл. лів. б. р. Десни, Стрижня, Білоусу
<i>Alneta (glutinosa) paludosa</i>	5	4	3	лп. "Кордівка", р-ни Подусівка, Павлівка
<i>Saliceta albae</i>	5	6	7	лп. "Кордівка", запл. р. Десни, Стрижня, Білоусу, півд. окол. міста
<i>Saliceta cinerea</i>	2	3	9	лп. "Кордівка", ур. "Подусівський ліс", запл. р. Десни, Стрижня, Білоусу, півд. окол. міста

Умовні позначення: \* – території, що мають природно-заповідний статус, лп. – лісопарк, ур. – урочище, РЛП – регіональний ландшафтний парк, р-н – район, окол. – околиці, півн. – північні, сх. – східні, пр. б. – правий берег, лів. б. – лівий берег, запл. – заплава, р. – річка, Ас – асоціації; видів дендрофлори: Д – дерев, Ч – чагарників; 5/2 – кількість природних видів / видів-інтродуцентів

На цій території розшашовано 5 груп асоціацій: *Pineta graminosa* (найбільш поширена), *Pineta myrtillosa*, *Pineta pteridiosa* та *Pineta hylocomiosa*. В угрупованнях *Pineta graminosa* домінують *Agrostis tenuis* Sibth, *Calamagrostis epigeios* (L.) Roth співдомінує *Elytrigia repens* (L.) Nevski. На невеликих площах трапляються ценози асоціації *Pinetum pteridiosum (aquilini)*, а на окремих природних соснових ділянках спостерігається вторгнення *Robibnia pseudoacacia* L. Найбільш різноманітним щодо ценозів формації *Pineta sylvestris* виступає "Подусівський ліс" (255 га), лісовий масив, розташований на лівій надзаплавній терасі р. Білоус. Він репрезентує різновікові соснові угруповання – від сухих злакових до зволжених зеленомохових та фрагментарно чорницевих.

Угруповання соснового лісу куничникового у трав'яному ярусі мають проективне покриття до 50%, серед них *Calamagrostis epigeios* (L.) Roth. – до 25 – 27%; в якості асектаторів виступають такі види, як: *Veronica spicata* L., *Euphorbia cyparissias* L., *Galium boreale* L., *Pimpinella saxifraga* L., *Peucedanum oreoselinum* (L.) Moench, *Veronica chamaedrys* L., *Viola canina* L., *Knautia arvensis* (L.) Coult, *Sedum rupestre* L., *Jurinea paczoskiana*, *Helychtysum arenarium* (L.) Moench.

Специфіка урочища "Подусівський ліс" полягає в тому, що тут нами відмічено молоді культури *Pinus sylvestris* висотою 8 – 10 м, відсутні на інших територіях соснових лісів зеленої зони міста Чернігова. На площах цих культур формуються різнотравні та кострицеві ценози, фрагментарно на окремих ділянках з розрідженим трав'яним покривом – синузії епігейних кущистих лишайників роду *Cladonia*.

Сосняки зеленомохові поширені на більш знижених вирівняних ділянках на території РЛП "Ялівщина", урочища "Подусівський ліс", у районі зеленої зони заводу автозапчастин. Моховий ярус цих ценозів сформований за участю *Pleurozium schreberi* (Willd. Ex Brid.) Mitt, *Dicranum rugosum* Sw. та *Politrichum juniteunum* Willd, з домінуванням першого виду.

На найбільш зволжених, улоговинних та заболочених ділянках урочища "Подусівський ліс" та північних околицях міста фрагментарно поширені угруповання асоціацій (далі ас.) *Pinetum myrtillosum* та *Pinetum franguloso-moliniosum (caeruleae)*, рідкісні для природних територій міста Чернігова, вони мають науковий інтерес як варіації гідрофільних сосняків.

У складі дендрофлори ценозів формації *Pineta sylvestris* представлені види аборигенної групи (11 видів), на окремих ділянках виявлено участь у деревному ярусі інтродуцентів (4), серед них *Pinus nigra* Am., *Padus virginiana* (L.) Mill., *Amelanchier ovalis* Medic, *Robibnia pseudoacacia*. Природне ядро даної групи лісів формує *Pinus sylvestris* L. з участю *Betula pendula* Roth., *Quercus robur* L., *Pyrus communis* L., *Malus sylvestris* Mill. Серед чагарників, в залежності від гідрологічних умов, слід зазначити участь видів роду *Rubus* (*R. idaeus* L., *R. nessesensis* W. Hall., *R. caesius* L.) та *Sambucus* (*S. nigra* L., *S. racemosa* L.).

Ділянки листяних лісів території досліджень репрезентовані трьома групами формацій – широколистяними, дрібнолистяними та листяними лісами заболоченими [7]. Широколистяні ліси представлені ценозами формації дубових та їх субформаціями, липових, ясенових, листяні заболочені – формацією вільхових лісів. Вони вимогливі до родючості ґрунтів та формуються як на суглинкових світло-

сірих і темно-сірих опідзолених, так і багатих різновидах дерново-підзолистих супіщаних ґрунтів. Діапазон вологості ґрунтів під широколистяними лісами достатньо широкий – від дуже сухих – до лісів з надлишковою зволоженістю.

Ценози формації *Querceta roboris* та субформацій за участю *Acer platanoides* L., *Tilia cordata* Mill., *Carpinus betulus* L., *Fraxinus excelsior* L. розміщені переважно на плакорних ділянках в східній, частково південній частині міста Чернігова. Вони сформувалися на сірих лісових суглинкових та дерново-підзолистих піщаних ґрунтах, їх поширення має фрагментарний та мозаїчний характер. Найпоширенішими є угруповання ас. *Quercetum franguloso-stellariosum*, у підліску яких переважають *Frangula alnus* Mill, *Corylus avellana* L. та *Euonymus verrucosa* Scop. Трав'яний покрив має покриття 50 – 70 %, у ньому домінують (або співдомінують) *Aegopodium podagraria* L., *Stellaria holostea* L., *Convallaria majalis* L., *Agrostis tenuis* L., зрідка співдомінує *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn.

Угруповання формації *Querceta roboris* характеризуються найбільшим ценотичним та дендрофлористичним різноманіттям, основу дендрофлори складають 17 аборигенних видів, з них 10 – дерева та 7 – чагарники. Дендрофлористичне ядро деревного ярусу даної групи ценозів формує *Quercus robur* із участю *Acer platanoides*, *Tilia cordata*, *Carpinus betulus*, *Fraxinus excelsior*, чагарникового – *Corylus avellana* з участю, в залежності від умов освітленості та зволоженості, таких видів як *Euonymus europaea* L., *E. verrucosa* Scop., *Rubus idaeus*, *R. caesius* та *Swida sanguinea* (L.) Opiz.

Едафічна приуроченість ценозів формації *Querceta roboris* визначає їх поширення на лісових острівних ділянках, що знаходяться у східній та північно-східній частинах міста Чернігова. Крім типових угруповань, у яких як домінувати трав'яного ярусу виступають *Aegopodium podagraria*, *Stellaria holostea*, в урочищі "Криволівщина" нами відмічено ас. *Quercetum coryloso-pteridiosum*.

В ценозах формацій *Querceta*, *Tilieta*, *Fraxineta*, що характеризують лісові ділянки в районі Новоселівки та східних околицях м. Чернігова нами виділено низку рідкісних видів, зокрема з Червоної книги України (2009) – *Allium ursinum* L., *Lilium martagon* L., *Platanthera bifolia* (L.) Rich., *Epipactis helleborine* (L.) Crantz, *Listera ovata* (L.) R. Br., *Neottia nidus-avis* (L.) Bich. та регіональної охорони, серед них – *Equisetum hyemale* L., *Polipodium vulgare* L., *Polystichum aculeatum* L. Їх зростання підвищує цінність та унікальність даної групи лісових ділянок у межах зеленої зони міста Чернігова. *Equisetum hyemale* на окремих ділянках виступає як співдомінант у складі окремих угруповань.

Ліси формації *Fraxineta excelsior* поширені переважно у центральній та східній частинах лісопарку "Кордівка". Вони займають невеликі площі і приурочені переважно до суглиннистих ґрунтів помірного зволоження. У двох'ярусному деревостані, зімкненість – (0,6 – 0,8), зростають у першому під'ярусі (24 – 26 м) – *Fraxinus excelsior* віком 50 – 70 років, поодинокі – *Populus tremula* L. та *Quercus robur*, у другому (18 – 20 м) – поодинокі *Tilia cordata*, *Acer platanoides*. Травостій (50 – 80%) утворюють здебільшого *Aegopodium podagraria* та *Stellaria holostea*, які мають проєктивне покриття від 30 – 70% в різних ценозах. В умовах підвищених острівців у заплаві р. Десни формуються ценози ас. *Fraxinetum sparsiherbosum*.

Науковий інтерес як пограничноареальні угруповання мають ценози ас. *Carpinetum caricosum (pilosae)* і *Carpinetum aegopodiosum (podagrariae)*, які нами відмічені на східних околицях міста Чернігова [7]. Вони є осередками поширення *Carpinus betulus* на східній частині ареалу та низки рідкісних видів, зокрема зозулинцевих.

Подібний склад деревних ярусів виявлено у ценозах формацій *Tilieta cordatae*, *Fraxineta excelsioris*, *Carpineta betulae*, який є більш збідненим кількісно. Для угруповань формації *Tilieta cordatae*, *Fraxineta excelsioris* дендрофлористичне ядро складають 13 видів, з них з них 6 – дерева та 7 – чагарники. Серед ясеневих ценозів відзначити участь інтродуцентів у формуванні підросту (*Acer negundo* L.) та чагарникового ярусу (*Amorpha fruticosa* L., *Physocarpus opulifolia* (L.) Maxim.).

Ценози *Betuleta pendulae* сформувалися на місці борів і суборів та приурочені до дерново-підзолистих піщаних, частково сірих лісових ґрунтів із різним ступенем їх зволоження. Значним флористичним різноманіттям відрізняються угруповання ас. *Betuletum coryloso-dryopteriosum* та *Betuletum pteridiosum* в урочищі "Криволівщина" та в околицях с. Павлівки і району заводу автозапчастин.

Деревний ярус березових лісів сформований як комплексне поєднання кількох видів, з переважанням – *Betula pendula* та окремими включеннями *Pinus sylvestris*, фрагментарно – *Populus tremula*, *Pyrus communis*, *Malus sylvestris*, *Quercus robur*. В чагарниковому ярусі слід відзначити в якості домінуючих – *Corylus avellana* L., *Frangula alnus* Mill. та *Amorpha fruticosa*. Найвища участь дерев і чагарників виявлена у складі асоціацій *Betuletum coryloso-dryopteriosum* та *Betuletum pteridiosum*.

Угруповання формації *Populeta tremulae* є похідними від дубових, про що свідчить склад трав'яного ярусу, приуроченість ценозів груп асоціацій *Populeta corylosa*, *Populeta frangulosa* і *Populeta amorfosa* до плакорних і заплавних ділянок північно-східних, східних і південно-східних околицях міста Чернігова.

Білотополеві та чорнотополеві ліси в межах міської зони поширені переважно в заплаві р. Десни (лісопарк "Кордівка"), фрагментарно в заплаві р. Білоус. В деревному ярусі даних угруповань у I ярусі *Populus alba* L., *Populus nigra*, а в II під'ярусі слід відзначити *Quercus robur*, *Alnus glutinosa* (L.) P. Gaertn.; серед чагарників – *Swida sanguinea*, *Rubus caesius*, *Amorpha fruticosa*. Їх флористичний склад визначається незначною кількістю видів, в основному з групи різнотрав'я (*Aristolochia clematis* L., *Urtica dioica*, *Urtica galeopsifolia*, *Lycopus europeus*, *Geum urbanum*, *Lysimachia numullaria*).

Тополеві ліси характеризуються одноманітністю деревного та чагарникового ярусів (їх основу формують 10 – 12 видів). В останньому деяких ценозів значна участь таких інтродуцентів як *Amorpha fruticosa* та *Physocarpus opulifolia*. Найбільша ценотична та видова різноманітність (дерев і чагарників) виявлена у формації *Populeta tremulae*.

Ценози формації *Alneta glutinosae* в межах регіону досліджень займають окремі площі у притерасних частинах заплав річок Десни, Стрижня і Білоусу та представлені 2 групами: ас. *Alneta rubosa (caesii)*, *Alneta frangulosa (alni)*. Типовою ас. виступає *Alnetum franguloso-urticosum (galeopsifoliae)*, ценози якої відмічені на

зволожених ділянках у заплаві р. Білоус. Флористичний склад її формується рядом гідрофільних видів – *Urtica galeopsifolia*, *Lithrum salicaria*, *Bidens tripartite*, *Calamagrostis neglectum*, у різному кількісному співвідношенні. Підлісок утворює *Salix cinerea*. Поодинокі в ньому трапляються *Frangula alnus*, *Rubus caesius*, з участю *Salix cinerea* L.. Досить часто навколо стовбурів *Alnus glutinosa* зростає *Humulus lupulus* L., який в'ється по стовбурах. Трав'яний покрив цих боліт має мозаїчний характер, що пов'язано із різною обводненістю угруповань формації протягом вегетаційного сезону.

Лісові евтрофні болота на території регіону досліджень займають незначні площі та представлені формацією *Alneta (glutinosa) paludosa*. Класичне місцезростання лісових боліт з домінуванням *Alnus glutinosa* – це притерасна частина заплави, перезволожена та багата мінеральними речовинами. Характерною особливістю вільшнякових боліт є мозаїчність рельєфу – наявність підвищень та міжстовбурових знижень. У зниженнях вільшняків зустрічаються осоки (*Carex riparia* Curtis, *Carex vesicaria* L., *Carex acutiformis* Ehrh., *Carex pseudocyperus* L.) та види гідрофільного різнотрав'я (*Calla palustris* L., *Menyanthes trifoliata* L., *Naumburgia thyrsoflora* (L.) Rchb.). На пристовбурових підвищеннях трапляються різні види папоротей (*Thelypteris palustris* Schott., *Dryopteris carthusiana* (Vill.) H. P. Fuchs., *Athyrium filix-femina* (L.) Roth., *Dryopteris cristata* (L.) Gray.), менш гідрофільні види осок (*Carex elongate* L., *Carex spicata* Huds.) та види лучно–болотного різнотрав'я.

Болотні формації *Alneta glutinosae* мають найбільш різноманітний видовий склад деревного і чагарникового ярусів. На фоні едификатора – *Alnus glutinosa*, інші види деревного ярусу (*Populus tremula*, *Betula pendula*, *Quercus robur*) не відіграють значної фітоценотичної ролі. Чагарниковий ярус сформований за участю видів роду *Rubus* (*R. caesius*, *R. nessesensis*), *Swida sanguine* та *Frangula alnus*.

Для регіону досліджень характерні також і чагарникові евтрофні болота, як домінуючий вид виступає *Salix cinerea*, утворюючи відповідну формацію. Розмішуються вони смугами уздовж трав'яних боліт, каналів і водотоків, мають часто характер тимчасових несформованих заростей. Найбільш поширеними угрупованнями виступають ас.: *Salicetum-caricosum* і *Salicetum phragmitosum*.

Вербові ліси приурочені до заплавної території правого берега р. Десни та представлені ценозами ас.: *Salicetum ruboso-caricosum*, *Salicetum ruboso-urticosum*. Вербові ліси відрізняються високим проєктивним покриттям чагарникового ярусу із видів роду *Salix*. В складі деревного ярусу слід виділити такі види як *Salix caprea*, *S. alba* L., *S. fragilis* L. Чагарниковий ярус характеризується значним різноманіттям видів (6) роду *Salix* (*S. triandra* L., *S. viminalis* L., *S. acutifolia* Willd., *S. rosmarinifolia* L., *S. pentandra* L., *S. cinerea* L.).

На природну складову дендрофлори міста Чернігова та його околиць, зокрема її ценотичну структуру, мають вплив види північно-американського, далекосхідного і азійського походження, що привело до натуралізації північно–американських адвентів (*Acer negundo*, *Amorfa fruticosa*, *Quercus rubra* L., *Physocarpus opulifolia*, *Robinia pseudoacacia*), у порушенні природні ценози, узлісся і придорожні території. Слід відзначити ряд територій в межах зеленої зони Чернігова, де сформовані

угруповання за участю наведених вище видів. Ці угруповання вказують про порушеність фітоценотичної структури природних систем. Найбільша кількість таких угруповань, але незначної площі, виділена нами на лісових територіях у районі с. Новоселівка, лісопарку "Кордівка", урочища "Кривулівщина" та РЛП "Ялівщина". Так, вздовж дороги в напрямку р. Десни в лісопарку "Кордівка" знаходиться загущена (зімкненість деревостану – 0,9) лісова ділянка з *Acer negundo* (середня висота 12 – 14 м) та *Amorpha fruticosa* (середня висота – 2 – 3 м) з розрідженим трав'яним покривом. В ньому слід відзначити види широкої екологічної амплітуди, а саме: *Geum urbanum*, *Urtica dioica*, *Galium aparine* L., *Lysimachia nummularia*. Стовбури окремих дерев обвиті *Humulus lupulus*. На даних ділянках спостерігається масовий підріст *Acer negundo* заввишки до 1 м.

Натуралізація та часткове вторгнення *Robinia pseudoacacia* спостерігається в соснові та березові ценози в районі заводу автозапчастин, північно-східних околицях міста Чернігова. В угрупованнях робінієвого лісу з участю *Pinus sylvestris* спостерігається формування різновидового підросту з *Robinia pseudoacacia*, *Ulmus glabra* Huds. Трав'яний ярус сформований видами широкої екологічної амплітуди, зокрема *Chelidonium majus* L., *Impatiens parviflora*, *Galium aparine*.

Вздовж лісових доріг спостерігається заростання окремих природних ділянок рядом адвентивних видів *Amorpha fruticosa*, *Acer negundo*, *Physocarpus opulifolia* з самосівом та вегетативним відтворенням.

Штучні насадження (формація *Robinieta pseudoacaciae*) відрізняються збідненою ценотичною структурою та видовим складом деревних рослин, в якому крім *Robinia pseudoacacia*, незначну участь мають такі види *Pinus sylvestris*, *Betula pendula*, *Sorbus aucuparia*, *Ulmus glabra*. Окремі зміни складу природних ценозів спостерігається внаслідок натуралізації та часткового вторгнення *Robinia pseudoacacia* (зокрема, у соснові та березові ценози у північно-східних околицях м. Чернігова), а також посиленої рекреації.

Таким чином, лісова рослинність міста Чернігова представлена 72 асоціаціями, що належать до 39 груп асоціацій та 14 формацій. Ценози формації *Pineta sylvestris* поширені на борових терасах річок Стрижня та Білоусу, частково річки Десни, на дерново-слабопідзолистих піщаних ґрунтах. Серед них переважають середньовікові культури, частково старі природні ділянки, які репрезентують групи асоціацій: *Pineta hylacomiosa* та *Pineta graminosa*.

Загальний розподіл видів природної дендрофлори пов'язаний з найбільшими осередками зеленої зони міста Чернігова, а саме з його лісо- і парковими територіями, міськими лісами, територіями вздовж магістралей та низки інших. За кількісними показниками багатства дендрофлори визначені формації утворюють такий ряд *Querceta roboris* – *Pineta sylvestris* – *Betuleta pendulae* – *Tilieta cordatae* – *Fraxineta excelsioris* – *Saliceta albae* – *Populeta tremulae* – *Alneta glutinosae* – *Saliceta cinereae* – *Populeta nigrae* – *Alneta glutinosae* – *Carpineta betulae* – *Populeta albae* – *Robinieta pseudoacaciae* – *Alneta (glutinosae) paludosa*.

## ВИСНОВКИ

1. На основі проведених досліджень зазначено ряд особливостей, які характерні для природних територій в межах міських зон Чернігівського Полісся. Так, ценози формації *Pineta sylvestris* репрезентовані різновіковими угрупованнями – від сухих злакових до зволжених зеленомохових та фрагментарно чорницевих, окремі з них – характеризуються розвиненим чагарниковим ярусом.
2. Угруповання формації *Querceta roboris* фрагментарно поширені на вододільних ділянках, на сірих лісових суглинкових ґрунтах і характеризуються найбільшим ценотичним та дендрофлористичним різноманіттям, які представлені у різних ярусах. Подібний склад деревних ярусів виявлено у ценозах формацій *Tilieta cordatae*, *Fraxineta excelsioris*, *Carpineta betulae*.
3. Ценози, що належать до формації *Betuleta pendulae*, сформувалися на місці борів та приурочені до дерново–підзолистих піщаних ґрунтів із різним зволоженням. Найвища участь дерев і кущів виявлена у складі асоціацій *Betuletum coryloso-dryopteriosum* та *Betuletum pteridiosum*.
4. Тополеві ліси характеризуються одноманітністю деревного та чагарникового ярусів. В останньому деяких ценозів значна участь таких інтродуцентів, як: *Amorpha fruticosa* та *Physocarpus opulifolia*. Найбільша ценотична та видова різноманітність (дерев і чагарників) виявлена у формації *Populeta tremulae*.
5. Вербові ліси відрізняються високим проєктивним покриттям чагарникового ярусу із видів роду *Salix*. Болотні формації *Alneta glutinosae* мають найбільш багатий видовий склад деревного і чагарникового ярусів.
6. Штучні насадження (формація *Robinieta pseudoacaciae*) відрізняються збідненою ценотичною структурою та видовим складом деревних рослин. Окремі зміни складу природних ценозів спостерігаються внаслідок натуралізації та часткового вторгнення *Robinia pseudoacacia*, зокрема у соснові та березові ценози, а також посиленої рекреації.
7. З'ясовано, що природна дендрофлора міста Чернігова, яка налічує 63 види із 39 родів та 24 родин, є типовою для Лівобережного Полісся. Види аборигенної дендрофлори входять до складу 14 лісових формацій, що представлені 72 асоціаціями.

## Список літератури

1. Дідух Я. П. Геоботанічне районування України та суміжних територій / Я. П. Дідух, Ю. Р. Шеляг–Сосонко // Укр. ботан. журн. – 2003. – Вип. 60. – №1. – С. 6 – 17.
2. Національний атлас України [Карти] / [редкол.: Б. Є. Патон, А. П. Шпак, Л. Г. Руденко та ін.]. – К. : Картографія, 2009: іл. – ISBN 978–966–475–560–0:792.00. – 440 с.
3. Потоцька С. О. Участь аборигенної фракції дендрофлори у формуванні системи зеленої зони м. Чернігова / С. О. Потоцька // Матеріали Міжнар. наук.-практ. конф. "Каразінські природничі студії". [Ювілейна конференція, присвячена 100-річчю професорів Харківського університету О. М. Матвієнко і Ю. М. Прокудіна]. – Харків. – 2011. – С. 202 – 204.
4. Екологія міста Чернігова // Інформаційний бюлетень. – Чернігів. – 1997. – 95 с.
5. Методика полевых геоботанических исследований. – М., Л. : Изд-во АН СССР. – 1938. – 214 с.
6. Андриенко Т. Л. Растительный мир Украинского Полесья в аспекте охраны. / Т. Л. Андриенко, Ю. Р. Шеляг – Сосонко. – К. : Наук. думка, – 1983. – 216 с.
7. Мулярчук С. О. Рослинність Чернігівщини. / С. О. Мулярчук – К. : Вища школа, – 1970. – 209 с.

Потоцкая С.А. Ценогическое и флористическое разнообразие природных территорий в пределах городских зон Черниговского Полесья / С.А. Потоцкая // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2014. – Т. 27 (66), № 3. – С.112-123.

На основе проведенных исследований выявлен ряд особенностей, которые характерны для природных территорий в пределах городских зон Черниговского Полесья. Установлено, что природная дендрофлора территории исследования насчитывает 63 вида, 39 родов, 24 семейства. Лесная растительность согласно доминантной классификации представлена 72 ассоциациями, принадлежащими к 14 формациям. Распространение сообществ и состав дендрофлоры обусловлен эдафо-климатическими и орографическими особенностями окрестностей города Чернигова.

Формации широколиственных лесов и их производных (*Querceta roboris*, *Tilieta cordatae*, *Fraxineta excelsioris*, *Carpineta betulae*), распространенных на плакорах, характеризуются наибольшим разнообразием видов древесного и кустарникового ярусов. К пойменным участкам рек приурочены формации *Populeta tremulae*, *Populeta albae*, *Populeta nigrae* и *Saliceta albae*, к притеррасным сообществам – *Alneta glutinosae*, к надпойменным террасам – *Pineta sylvestris*.

**Ключевые слова:** фиторазнообразие, дендрофлора, Черниговское Полесье, город Чернигов, городские зоны.

## COENOTIC AND FLORISTIC DIVERSITY OF NATURAL AREAS WITHIN URBAN ZONES OF CHERNIHIV POLISSIA

Pototska S.O.

Chernigov State Pedagogical Taras Shevchenko University, Chernigov, Ukraine  
E-mail: sav-14@mail.ru

Based on the conducted researches, a number of features should be noted, that are typical for the natural areas within urban zones of Chernihiv Polissia. It was found that natural dendroflora of Chernihiv contains 63 species, 39 genera, 24 families. Forest vegetation in accordance with the dominant classification is represented by 72 associations which belong to 14 formations. Systematic, bio-morphological, ecological and geographical analyses of cultivated dendroflora were made.

Cenoses of *Pineta sylvestris* formation are spread on sandy terraces of Stryzhen and Bilous rivers, partially of Desna river, on sod low-podzolic sandy soils. Among them middle-aged plantings prevail, partially old natural areas, which represent groups of associations: *Pineta hylocomiosa* and *Pineta graminosa*.

There are occasionally groupings of *Pinetum pteridiosum (aquilini)* association on sabulous soils. The latest and some other cenoses of pine forests are characterized by developed shrub layer, at some plots a content of introduced species (*Pinus nigra*, *Padus virginiana*) is found in a tree layer.

Groupings of *Querceta roboris* formation are fragmentarily spread at watershed areas, at grey forest clay-loam soils and are characterized by the largest cenotic and dendrofloral diversity, which are represented at different layers. A similar composition of tree layers is found in cenoses of *Tilieta cordatae*, *Fraxineta excelsioris*, *Carpineta betulae* formations. The latest are found occasionally, unlike other broad-leaved forests they have simplified and smaller in species composition structure of the tree layer, but are characterized by high zoological factors (5 species are from the Red Book of Ukraine (2009).

Cenoses, which belong to *Betuleta pendulae* formation, were formed in place of pinewoods and confined to the sod-podzol sandy soils with different moisture. The largest content of trees and shrubs is found in the composition of *Betuletum coryloso-dryopteriosum* and *Betuletum pteridiosum* associations.

Poplar forests are characterized by uniformity of tree and shrub layers. In the latest of some cenoses there is a large content of the following introduced species: *Amorpha fruticosa* and *Physocarpus opulifolia*. The largest cenotic and dendrofloral diversity (of trees and shrubs) is found in formation *Populeta tremulae*. Willow forests are characterized by high plant cover of shrub layer containing species of *Salix* genus.

Bog formations *Alneta glutinosae* have the smallest species composition of tree and shrub layers.

Artificial stalks (formation *Robinieta pseudoacaciae*) is characterized by impoverished cenotic structure and species composition of woody plants. Occasional changes in the composition of natural cenoses occur as a result of naturalization and partial irruption of *Robinia pseudoacacia* (particularly in pine and birch cenoses at the north-eastern outskirts of Chernihiv), and also of enhanced reaction.

The overall distribution of species of natural dendroflora is connected with the largest centers of the green area of Chernihiv, including its forest-park territories, suburban forests along Desna river and its tributaries, and is caused by edaphic regime, orographic peculiarities of the territory and by structure of cenoses.

**Keywords:** dendroflora, Chernihiv Polissia, Chernihiv, urban zones, phytodiversity.

#### References

1. Didukh Y.P., Sheliag-Sosonko Y.R. Geobotanical subdivision of Ukraine and adjacent territories, *Ukrainian botanic magazine*, **60**, №1, 6-17 (2003).
2. The National Atlas of Ukraine [Maps], [Editorial board.: B. Y. Paton, A. P. Shpak, L. G. Rudenko, and others.], 440 p. (Cartography, 2009).
3. Pototska S.O. Participation of native fraction of dendroflora in formation of the Chernigov green zone system. International Scientific and Practical Conference "Karazin natural science studios", 202 – 204 (Kharkov, 2011).
4. Chernigov's ecology, 95 p. (Chernihiv, 1997).
5. Methods of the field geobotanical research, 214 p. (Publisher AS USSR, 1938).
6. Andriyenko T.L., Sheliag-Sosonko Y.R. The flora of Ukrainian Polesye in respect of the aspect of conservation, 216 p. (Naukova dumka, 1983).
7. Muliarchuk S.O. Chernihiv flora, 209 p. (Vyshcha shkola, 1970).

Поступила в редакцію 16.10.2014 з.

УДК 579.64:581.14(635.63)

## ВЛИЯНИЕ МИКРОБНОГО ПРЕПАРАТА ЭМБИКО® НА ПЛОДООБРАЗОВАНИЕ ОГУРЦОВ И БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ПОЧВЫ

*Ржевская В.С.<sup>1</sup>, Отурина И.П.<sup>1</sup>, Булыгин С.В.<sup>2</sup>, Теплицкая Л.М.<sup>1</sup>*

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

<sup>2</sup>*ООО «Пансионат «Орбита-2», Евпатория, Россия*

*E-mail: viktoriyar45@mail.ru*

Изучено влияние микробного препарата Эмбико® на рост и плодообразование огурцов сортов Конкурент и Феникс плюс, а также гибрида Пасалимо F1. Показано, что эффективность обработки микробным препаратом зависит от сроков и способов внесения в среду выращивания растений. Установлено, что Эмбико® обогащает естественные почвенные микробоценозы почвы агрономически полезными группами микроорганизмов, в частности, азотфиксаторами, аммонификсаторами, нитрификаторами, олигонитрофилами, фосфатмобилизаторами и целлюлозолитиками. Микробный препарат Эмбико® улучшает физико-химические свойства почвы, увеличивая ее ферментативную активность, что приводит к повышению почвенного плодородия, и, как следствие, к повышению урожайности.

**Ключевые слова:** микробный препарат Эмбико®, огурцы, ростовые процессы, урожайность, ферментативная активность почвы.

### ВВЕДЕНИЕ

В связи с возрастанием интереса к получению экологически чистой растительной продукции повышение урожайности культурных растений в условиях экологизации аграрно-промышленного комплекса является одной из актуальных проблем современного сельскохозяйственного производства.

Среди перспективных технологий органического земледелия особое место занимает применение созданных на основе живых микроорганизмов или их метаболитов микробных препаратов, которые обладают ростстимулирующими свойствами, увеличивают поглощение элементов питания растениями, подавляют развитие фитопатогенных микроорганизмов, усиливают устойчивость растений к стрессовым факторам [1-5]. Использование микробных препаратов на основе симбиотических микроорганизмов, одновременно оказывающих положительное влияние как на рост и развитие растений, так и на состояние почвы, является эффективным способом повышения урожайности сельскохозяйственных культур [6-7].

Эмбико® – комплексный микробный препарат, в состав которого входят молочнокислые бактерии, пурпурные несерные бактерии, сахаромицеты и продукты их метаболизма. Каждая из перечисленных групп микроорганизмов обладает специфическими свойствами. Так, молочнокислые бактерии стимулируют прорастание семян и ростовые процессы растений в целом, а также подавляют

развитие фитопатогенных и кишечных условно-патогенных микроорганизмов благодаря антибиотическим свойствам и снижению pH за счет секреции органических кислот [8]. Спирты, выделяемые дрожжевыми грибами сахаромикетами, усиливают антибиотическое действие метаболитов молочнокислых бактерий. Пурпурные несерные бактерии снижают токсическое действие хлоридного засоления и засухи, оказывая тем самым антистрессовое воздействие на растения. Кроме того, микроорганизмы, входящие в состав Эмбико®, переводят недоступные для растений формы фосфатов в растворимые формы, фиксируют атмосферный азот, и тем самым изменяют физико-химическую структуру почвы, увеличивая в ней содержание мелких фракций [9-10].

Устойчивость молочнокислых бактерий к агрессивным химическим факторам среды, в частности, к используемым в ветеринарии антибиотикам, их высокая ферментативная активность [8] и способность колонизировать корни растений [11], а также широкий спектр метаболических путей у пурпурных несерных бактерий должны способствовать быстрой адаптации микробных компонентов Эмбико® к почвенной среде обитания, в которой они совместно с аборигенной микрофлорой смогут образовывать активно функционирующие ассоциации.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния микробного препарата Эмбико® на процесс плодообразования огурцов, а также биологическую активность почвы.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для изучения влияния микробного препарата на ростовые процессы и плодообразование огурцов проведена серия опытов с использованием разных способов внесения Эмбико® (полив, опрыскивание) в среду выращивания растений. Для экспериментов были выбраны сорта огурцов Конкурент и Феникс плюс, а также гибрид Пасалимо F1.

Конкурент – раннеспелый, высокоурожайный, пчелоопыляемый сорт. Растение длинноплетистое, не любит затенённости. Плоды крупнобугорчатые, черношипые, длиной 10-14 см, масса плодов до 130 г. Урожайность – 3,3-3,8 кг/м<sup>2</sup>. Сорт среднеустойчив к пероноспорозу и оливковой пятнистости, устойчив к мучнистой росе, ложной мучнистой росе и бактериальной пятнистости.

Феникс плюс – среднеранний пчелоопыляемый сорт огурцов. Растение сильнорослое, ветвистое, женского типа цветения. Длина главной плети – 200-250 см, Плод эллипсоидной формы, темно-зеленый, длиной 10,5-12,5 см, весом 75-95 г. Сорт имеет долгий период плодоношения (до 2,5 месяцев) и довольно обильное (6 кг/м<sup>2</sup>) плодоношение. Обладает комплексной устойчивостью к заболеваниям – достаточно стойкий к пероноспорозу, один из самых устойчивых сортов к ложной мучнистой росе.

Пасалимо F1 – партенокарпический раннеспелый гибрид огурца корншонного типа. Растение среднерослое, женского типа цветения. Зеленец короткий, цилиндрический, длиной 6-9 см, тёмно-зелёный, крупнобугорчатый, опушение белое, плотное. Масса зеленца – 80-90 г. В одном узле формирует 2-3 плода. Плоды выровненные, не перерастают, долго сохраняют товарные качества.

Гибрид устойчив к оливковой пятнистости, мучнистой росе, толерантен к вирусу обыкновенной мозаики огурца. Предназначен для выращивания в открытом грунте и плёночных теплицах.

Первую серию опытов проводили в закрытом грунте – в пленочной теплице западно-восточной ориентации длиной 10 м, шириной 3 м и высотой в коньке 2,2 м. Перед посадкой участок был обработан мотоблоком «Зірка» на глубину 20 см. В ходе экспериментов 22-дневные растения рассады огурцов гибрида Пасалимо F1, полученной путем высева семян огурцов в рассадные кассеты, были высажены в теплицу. Микробный препарат Эмбико® вносили методом полива под корень дважды – через 7 и 14 дней с момента высадки рассады на постоянное место с нормой расхода 50 мл препарата в 5 л воды (1:100).

Вторая серия опытов проводилась в открытом грунте на участке площадью 9×9 м с 16.04 по 02.08.2014 г. Сухие семена растений огурца сортов Конкурент и Феникс высаживали в почву (в 2 ряда по 15 растений в каждом) и поливали водопроводной водой.

Схема опыта:

Вариант 1 (контрольный) – полив растений водопроводной водой на протяжении всего опыта.

Вариант 2 – опрыскивание растений микробным препаратом Эмбико® в фазе появления 5-и настоящих листьев (на 38-е сутки), когда начинается распускание первых цветков и рост боковых побегов.

Вариант 3 – опрыскивание растений микробным препаратом Эмбико® в фазе цветения (на 50-е сутки).

Вариант 4 – опрыскивание растений микробным препаратом Эмбико® в фазе двух настоящих листьев (на 31-е сутки) и в фазу цветения (на 50-е сутки).

Вариант 5 – опрыскивание растений микробным препаратом Эмбико® в фазе пяти настоящих листьев (на 38-е сутки) и полив в фазу цветения (на 50-е сутки).

Для опрыскивания и полива использовали препарат Эмбико® в разведении 1: 500, т.е. 10 мл препарата на 1,5 л воды. Сбор урожая осуществляли, когда длина зеленцов огурцов достигала в среднем 10 см.

Микробиологический анализ почвы, а также и ее ферментативная активность исследовались во второй серии опытов (в открытом грунте). Отбор почвенных проб (первый – в начале эксперимента перед посевом семян огурцов; второй – после сбора урожая) проводили по общепринятой методике: пробу для анализа отбирали на участке в пяти точках по принципу конверта с глубины 0-20 см [12]. Образцы почвы смешивали для получения интегрированной почвенной пробы. Сразу после отбора проб во влажных почвенных образцах определяли содержание и состав экологотрофических групп микроорганизмов. Часть каждой почвенной пробы высушивали до воздушно-сухого состояния и использовали для анализа численности почвенных микроорганизмов, а также изучения физических свойств почвы.

Микробиологический анализ почвы проводили согласно общепринятым в почвенной микробиологии методам при культивировании микроорганизмов на соответствующих селективных питательных средах. Аммонифицирующие микроорганизмы выявляли на МПБ, нитрифицирующие – на среде Виноградского,

денитрифицирующие – на среде Гильтея, анаэробные азотфиксаторы – на среде Виноградского, аэробные – на среде Эшби, фосфатмобилизующие – на среде Муромцева, микромицеты – на среде Сабуро, целлюлозоразрушающие микроорганизмы – на средах Гетчинсона и Виноградского, актиномицеты – на КАА [13]. Для оценки морфофункциональной структуры микробного сообщества и направленности процессов трансформации органического вещества рассчитывали показатели напряженности минерализационных процессов – коэффициенты минерализации–иммобилизации азота как отношение между микроорганизмами, которые используют минеральный и органический азот [14].

Каталитическую активность почв определяли газометрическим методом, пероксидазную – йодометрическим титрованием с использованием в качестве субстрата пирокатехина, дегидрогеназную – по восстановлению ТТХ [15]. Все исследования проводили в 3-х кратной повторности.

Полученные результаты статистически обработаны с использованием пакета прикладных программ *Microsoft Office*. Достоверность разницы между сравниваемыми величинами оценивалась с помощью критерия Стьюдента при  $t = 3,2$  [16].

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенных экспериментов по изучению влияния обработки гибрида огурца Пасалимо F1 микробным препаратом Эмбико® в разведении 1:100 методом полива под корень показали, что инокуляция почвы микроорганизмами оказывала слабое стимулирующее воздействие на ростовые процессы растений (табл. 1).

Так, длина центральной плети растений огурца в опытном варианте была на 9,0 % больше, чем в контроле. Количество боковых плетей в опытном варианте по сравнению с контролем не изменилось, и хотя их длина по сравнению с контролем и увеличилась на 6,8 %, также как и размеры листовой пластинки, эта разница была недостоверна. Тем не менее, даже сравнительно небольшое увеличение размеров фотосинтезирующей поверхности листьев, как правило, повышает эффективность процесса фотосинтеза и положительно сказывается на урожайности растений.

Применение микробного препарата не оказало выраженного положительного влияния не только на развитие вегетативных органов растений, но и на их репродуктивную функцию. Количество сформировавшихся из завязей плодов, а также их длина в контрольном и опытном вариантах отличались незначительно (10,1–10,4 см).

В целом, данные результаты свидетельствуют о том, что обработка микробным препаратом Эмбико® методом двукратного полива под корень сформировавшихся 30- и 45-дневных растений гибрида огурца Пасалимо F1 не оказала существенного влияния на процессы их роста и плодообразования.

В опыте, проведенном в открытом грунте, кроме полива микробным препаратом Эмбико® проводилось опрыскивание растений в фазе двух и пяти настоящих листьев, а также в фазу цветения (табл. 2).

**Таблица 1**

**Влияние микробиологического препарата Эмбико® на морфометрические показатели огурцов гибрида Пасалимо F1 в закрытом грунте**

Показатели	Варианты опыта		Критерий Стьюдента t
	контроль	полив под корень Эмбико® (1:100)	
длина центральной плети, см	100,0 ± 1,4	109,0 ± 1,28*	4,89
количество боковых плетей, шт.	4,0	4,0	0
длина боковых плетей, см	29,5 ± 0,8	31,5 ± 0,6	2,0
ширина листовой пластинки, см	22,0 ± 0,4	23,5 ± 0,5	2,34
количество завязей, шт.	15,0 ± 0,4	16,0 ± 0,3	2,0
количество плодов, шт.	4,0 ± 0,3	5,0 ± 0,3	2,38
длина плода, см	10,4 ± 0,3	10,1 ± 0,2	0,83

*Примечание:* в табл. 1 и последующих таблицах указаны средние ± стандартная ошибка средней при  $p < 0,05$ .

\* – достоверные различия по сравнению с контролем при  $p < 0,05$  (критерий Стьюдента  $t \geq 3,2$ ).

Однократное опрыскивание огурцов сортов Феникс и Конкурент в фазу цветения (вариант 3) вызвало наименьшую прибавку к урожаю по сравнению с контролем – 6,0 и 2,0 % соответственно. При опрыскивании огурцов в более ранний период – в фазу 5-и настоящих листьев (вариант 2) величина урожая возросла у этих же сортов на 19,2 и 22,5 % по сравнению с контролем (вариант 1).

Двукратная обработка микробным препаратом Эмбико® оказалась эффективнее однократной. Так, при двукратном опрыскивании в фазу 2-х настоящих листьев и в фазу цветения (вариант 4) урожай зеленцов у сорта Конкурент увеличился на 34,1 %, а у сорта Феникс плюс – на 60,2 % по сравнению с контролем. При поливе в фазу 5-ти настоящих листьев и опрыскивании в фазу цветения (вариант 5) величина урожая у сорта Феникс плюс возросла на 56,5 %, а у сорта Конкурент – на 66,2 % по сравнению с контрольным вариантом. К аналогичным выводам пришла и Л. М. Полянская при исследовании стимуляции роста и развития сельскохозяйственных культур при сочетании различных способов обработки растений чистыми штаммами микроорганизмов [17]. Разница в прибавке урожая у сорта Феникс плюс в вариантах 4 и 5 была не существенной (1,4 %), у сорта Конкурент она была более выраженной (22,4 %).

Возрастание валового сбора плодов огурцов в вариантах 4 и 5 может быть связано с увеличением содержания в почве метаболитов микробного происхождения, в том числе и ауксинподобных регуляторов роста и других биологически активных веществ.

Таблица 2

Влияние микробного препарата Эмбико® на размеры плодов и урожайность огурцов сортов Конкурент и Феникс плюс, выращенных в открытом грунте

Показатели	Варианты опыта				
	1	2	3	4	5
сорт Феникс плюс					
длина плода, см	11,5 ± 0,9	11,2 ± 0,6	11,2 ± 0,7	10,8 ± 0,5	11,5 ± 0,8
масса плода, г	96,2 ± 4,2	102,5 ± 4,7	88,6 ± 3,8	85,3 ± 3,4	87,3 ± 3,7
количество плодов с участка, шт.	205 ± 5,8	230 ± 6,7*	237 ± 6,9*	372 ± 7,9*	360 ± 7,7*
количество плодов, %	100	112,2*	115,6*	181,5*	175,6*
общая масса плодов с участка, кг	19,781	23,575*	20,976*	31,693*	31,415*
общая масса, %	100	119,2*	106,0*	160,2*	158,8*
сорт Конкурент					
длина плода, см	10,7 ± 0,3	11,0 ± 0,3	10,7 ± 0,3	10,6 ± 0,3	10,4 ± 0,3
масса плода, г	112,9 ± 3,6	116,7 ± 5,6	110,0 ± 3,4	106,7 ± 4,7	101,7 ± 4,6
количество плодов с участка, шт.	219 ± 6,2	260 ± 4,8*	229 ± 4,7*	311 ± 7,6*	381 ± 8,9*
количество плодов, %	100	118,7*	104,5*	142,0*	173,9*
общая масса плодов с участка, кг	24,758	30,319*	25,255*	33,196*	38,756*
общая масса, %	100	122,5*	102,0*	134,1*	156,5*

Известно, что ауксины влияют на сексуализацию цветков, особенно у растений с раздельнополоыми цветками, сдвигая пол в сторону преобладания женских цветков [18]. Кроме того, в ранее проведенном анализе среди микробных метаболитов Эмбико® обнаружены фталаты, усиливающие рост боковых побегов и листьев, а также ускоряющие развитие дифференцирующихся зачатков генеративных и вегетативных органов, что в дальнейшем положительно сказывается на органообразовательных процессах растений [19]. В наших экспериментах микробные метаболиты на 3 дня ускоряли формирование зеленцов у обоих исследуемых сортов огурцов и продлевали срок плодоношения на 14 дней.

Несмотря на увеличение валового сбора огурцов при использовании препарата Эмбико®, его применение требует микробиологического обоснования на основе выявления закономерностей функционирования микробного ценоза как одного из диагностических критериев оценки экологического состояния почвы и ее плодородия. Результаты микробиологического анализа почвы, проведенного в период вегетации огурцов, произрастающих в открытом грунте, представлены в табл. 3.

Таблица 3

Влияние микробного препарата Эмбико® на численность микроорганизмов азотного, фосфорного и углеродного обмена в слое почвы 0-20 см на протяжении вегетационного периода огурцов (на 1 г абсолютно сухой почвы)

Определяемые группы микроорганизмов	Вегетационный период		
	начало	окончание	
		контроль	опыт
аммонификаторы	0,9 млн.	1,98 млн.	3,3 млн.
нитрификаторы	не обнаружено	0,8 тыс.	1,2 тыс.
денитрификаторы	700 тыс.	не обнаружено	не обнаружено
азотфиксаторы:			
1) кловстридии (АнА)	100 тыс.	не обнаружено	не обнаружено
2) азотобактер (АА)	1,2 млн.	1,5 млн.	1,9 млн.
3) олигонитрофилы (А)	120 тыс.	140 тыс.	230 тыс.
актиномицеты	5,4 тыс.	7,2 тыс.	9,5 тыс.
микромикцеты	5,2 тыс.	6,16 тыс.	49,9 тыс.
целлюлозолитики	не обнаружено	не обнаружено	215 тыс.
фосфатмобилизаторы	2,9 млн.	3,5 млн.	4,7 млн.

Примечание: АнА – анаэробные азотфиксаторы; АА – аэробные азотфиксаторы; А – азотфиксаторы.

В почве опытных вариантов после внесения Эмбико® как в начале, так и в конце вегетационного периода выявлено усиление жизнедеятельности практически всех групп микроорганизмов, особенно целлюлозоразрушающих бактерий, фосфатмобилизующих микроорганизмов, олигонитрофилов, а также минерализаторов органических веществ. Представителей фитопатогенных грибов из родов *Fusarium*, *Alternaria*, *Scopulariopsis*, *Stachybotrys* обнаружено не было.

Известно, что растения способны поглощать азот из почвы как в форме катиона  $\text{NH}_4^+$ , так и аниона  $\text{NO}_3^-$  [20]. К микроорганизмам, обуславливающим азотное питание растений, относятся аммонификаторы, минерализующие органические соединения до доступного для растений аммиака, нитрифицирующие бактерии, окисляющие аммиак до нитратов, а также азотфиксирующие микроорганизмы. Таким образом, исходя из различий в численности почвенных аммонификаторов, нитрификаторов и денитрификаторов, можно судить об интенсивности и направленности происходящих процессов превращений азотсодержащих соединений.

При внесении микробного препарата Эмбико® выявлена тенденция обогащения естественного микробного ценоза почвы агрономически полезными группами микроорганизмов. Численность аммонифицирующих бактерий увеличилась на

66,7 %, а нитрифицирующих – на 50,0 %, по сравнению с контролем. Увеличение количества этих групп микроорганизмов свидетельствует о том, что микробный препарат Эмбико® стимулирует процесс обогащения почвы доступными для растений формами азота.

В конце вегетационного периода ни в контрольном, ни в опытных вариантах денитрифицирующие бактерии не выявлены, следовательно, биологическое восстановление почвенных нитратов до молекулярного газообразного азота не происходит, а значит, потери почвенного азота сведены к минимуму.

Гранулометрический анализ почвы показал, что в результате применения препарата Эмбико® удельное содержание мелких почвенных фракций повышается до 18 % по сравнению с контролем (13 %). Таким образом, внесение микробного препарата сделало почву более рыхлой. Уменьшение размера почвенных частиц приводит к увеличению сорбции воды и активизации почвенной аэрации, следовательно, улучшает ее физико-химические свойства почвы [10]. Однако даже в хорошо аэрируемых почвах возможно протекание анаэробных процессов [21-22], в том числе и денитрификации – нитратного дыхания, в котором могут участвовать входящие в состав Эмбико® пурпурные несерные бактерии. Несмотря на положительное влияние этой группы бактерий, способных фиксировать молекулярный азот, на растения, они могут оказать и негативное воздействие на состояние почвы за счет интенсификации осуществляемых ими процессов денитрификации, приводящих к потерям почвенного азота. Тем не менее, необходимо учитывать, что при попадании в почву пурпурные несерные бактерии благодаря многообразию своих метаболических путей могут получать энергию не только в результате диссимиляционного восстановления нитратов, но и в ходе фотосинтеза, брожения или аэробного дыхания.

Согласно Клейну и Тайеру в почвенных агрегатах различают три зоны: аэробную – на внешней стороне агрегата, микроаэробную – с порами, заполненными как воздухом, так и водой, и анаэробную, расположенную в центре агрегата и заполненную водой [23]. На поверхности почвенных агрегатов в аэробных условиях обитает наибольшая микробная биомасса. Вероятно, попадая в почву, пурпурные несерные бактерии благодаря своему многообразию метаболических путей и отношению к кислороду (факультативные анаэробы) могут распределяться во всех зонах почвенных агрегатов. Поскольку наибольшая микробная масса обитает именно в аэробных условиях, и к тому же Эмбико® увеличивает количество мелких агрегатов, то эти факты свидетельствуют в пользу того, что метаболизм пурпурных несерных бактерий будет протекать по пути аэробного дыхания, что снижает вероятность активации денитрификации.

Изучение численности азотфиксирующих микроорганизмов как в опытных, так и контрольном вариантах показало, что азотфиксация в аэробных условиях в конце вегетационного периода проходила более интенсивно, чем в его начале. Так, в результате внесения Эмбико® в почву численность азотобактера увеличилась на 26,8 % по сравнению с контрольным вариантом. Количество олигонитрофилов в опытном варианте возросло по сравнению с контролем на 64,3 %. Анаэробные

азотфиксаторы в конце вегетационного периода не были обнаружены, что могло быть связано с улучшением режима почвенной аэрации.

Количество фосфатмобилизующих микроорганизмов в результате применения Эмбико® возросло в 34,3 раза по сравнению с контролем.

Использование микробиологического препарата Эмбико® для полива сельскохозяйственных культур создает благоприятные условия для функционирования комплекса целлюлозоразрушающей микрофлоры, в состав которой входят микромицеты и целлюлозоразрушающие бактерии. Развитие целлюлозоразрушающих микроорганизмов обеспечивает оптимальную трансформирующую способность сапрофитной микрофлоры и стабильность функциональных связей между эколого-трофическими группами. В результате проведенного эксперимента установлено, что численность микромицетов в опытном варианте возросла в 8,0 раз по сравнению с контролем. Среди почвенных микроскопических грибов преобладали представители родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor*. В начале вегетационного периода целлюлозоразрушающая бактериальная микрофлора не обнаружена, в конце вегетационного периода в опытном варианте выявлены споровые и неспоровые формы этих бактерий.

При определении численности актиномицетов установлено, что их количество в начале вегетационного периода было значительно ниже, чем других аммонификаторов, выделенных на МПА. Это подтверждается и величиной коэффициента минерализации, показывающего отношение численности микроорганизмов, усваивающих минеральные формы азота на КАА (актиномицеты), к численности аммонифицирующих бактерий на МПА (табл. 4).

Таблица 4

**Коэффициент минерализации в почве**

Период отбора почвенных образцов		Коэффициент минерализации
начало вегетационного периода		0,006
окончание вегетационного периода	контроль	0,004
	опыт	0,003

Установлено, что в начале вегетации растений количество доступных форм азота, также как и численность актиномицетов в контрольном и опытном вариантах были значительно меньше, чем в конце вегетационного периода. Коэффициент минерализации свидетельствует о том, что в опытном варианте количество доступных форм азота возросло по сравнению с контрольным вариантом.

Одним из важных показателей биологической активности почвы является ее ферментативная активность, которая определяет интенсивность и направленность биохимических процессов, влияющих на плодородие почвы. Ферментативная активность является на сегодняшний день самым доступным и чувствительным показателем экологической оценки состояния почв, уровня их плодородия, в процессе формирования которого и в целом почвообразования важное значение имеют такие ферменты, как пероксидаза, дегидрогеназа и каталаза, которые относятся к классу

оксидоредуктаз, катализирующих окислительно-восстановительные реакции.

Результаты исследования ферментативной активности представленных образцов почвы представлены в таблице 5.

**Таблица 5**

**Влияние микробиологического препарата Эмбико®  
на ферментативную активность почвы**

Ферментативная активность	Вегетационный период		
	начало	окончание	
		контроль	опыт
каталаза, см <sup>3</sup> /1 г/1 мин	14,7 ± 0,08*	15,6 ± 0,26*	20,1 ± 0,82*
пероксидаза, ед. относ. акт.	4,2 ± 0,05*	4,3 ± 0,07*	4,4 ± 0,02*
дегидрогеназа, ед. относ. акт.	3,2 ± 0,08*	4,1 ± 0,06*	4,5 ± 0,05*

В результате изучения ферментативной активности почвы показано, что согласно шкале степени обогащенности почв ферментами по Звягинцеву, по количеству каталазы почва соответствует уровню «богатых» почв, по уровню дегидрогеназы относится к средне обогащенным [15]. По окончанию вегетационного периода в контрольном варианте каталазная активность по сравнению с началом вегетационного периода возросла незначительно – на 6,1 %, в варианте с применением Эмбико® – на 36,7 %. Активность пероксидазы в конце вегетационного периода в контрольном варианте увеличилась на 2,4 % по сравнению с началом вегетационного периода, а в результате применения Эмбико® – на 4,8 %. Дегидрогеназная активность в почвенных образцах в контрольном варианте в конце вегетационного периода возросла на 28,1 % по сравнению с началом вегетационного периода, а в варианте с применением Эмбико® – на 40,6 %.

Таким образом, применение микробиологического препарата Эмбико® повышает биологическую активность почвы. Увеличение активности ферментов свидетельствует о возрастании физиологической активности почвенной микрофлоры, оказывающей непосредственное влияние на уровень плодородия почвы.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Обработка микробным препаратом Эмбико® сформировавшихся 30- и 45-дневных растений гибрида огурца Пасалимо F1 методом двукратного полива под корень не оказала существенного влияния на процессы роста и плодообразования.
2. При однократном опрыскивании растений огурцов сортов Феникс плюс и Конкурент микробным препаратом Эмбико® в разведении 1:500 в фазу 5-ти настоящих листьев урожай зеленцов возрос на 19,2 и 22,5 % соответственно, в то время, как при двукратном опрыскивании и комбинированной обработке растений (полив и двукратное опрыскивание) данный показатель у сорта

Конкурент увеличился на 34,1 % и 56,5 %, а у сорта Феникс – на 60,2 % и 58,8 % соответственно по сравнению с контролем.

3. Повышение в почве содержания микробных метаболитов Эмбико® активировало формирование женских цветков и ускорило образование зеленцов у обоих исследуемых сортов огурцов, а также удлинило период плодоношения растений на 14 дней.
4. При внесении микробного препарата Эмбико® в почву выявлена тенденция обогащения естественного почвенного микробного ценоза агрономически полезными группами микроорганизмов: численность аммонификаторов возросла на 66,7 %, нитрифицирующих бактерий – на 50,0 %, азотобактера – на 26,8 %, олигонитрофилов – на 64,3 %, а фосфатмобилизующих микроорганизмов – в 34,3 раза по сравнению с контролем. Анаэробные азотфиксаторы и денитрификаторы в почвенных образцах в конце вегетационного периода не выявлены.
5. Использование микробного препарата Эмбико® для полива сельскохозяйственных культур создает благоприятные условия для функционирования комплекса целлюлозолитиков, в частности, микромицетов (представители родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor*), численность которых в опытном варианте возросла в 8,0 раз по сравнению с контролем.
6. Почва после внесения в нее микробного препарата Эмбико® стала более мелко структурированной; к концу вегетационного периода ее каталазная активность возросла на 36,7 %, а дегидрогеназная активность – на 40,6 %, что свидетельствует об интенсификации метаболических процессов микрофлоры, определяющей уровень почвенного плодородия.

#### Список литературы

1. Орлова О.В. Повышение плодородия почв при активизации почвенной микрофлоры, регулируемой биоудобрениями / О.В. Орлова // Сельскохозяйственная биология. – 2011. – № 3. – С. 94–97.
2. Петров В.Б. Микробиологические препараты в практическом растениеводстве России: функции, эффективность, перспективы / В.Б. Петров, В.К. Чеботарь // Рынок АПК. – 2009. – № 7. – С. 16–18.
3. Сидоренко О.Д. Перспективы использования биологических препаратов на основе микроорганизмов / О.Д. Сидоренко // Известия ТСХА. – 2012. – Вып. 6. – С. 70–79.
4. Фатина П.Н. Применение микробиологических препаратов в сельском хозяйстве / П.Н. Фатина // Вестник Астраханского государственного технического университета. – 2007. – № 4 (39). – С. 133–136.
5. Чеботарь В.К. Биохимические критерии оценки агрономически значимых свойств бацилл, используемых при создании микробиологических препаратов / В.К. Чеботарь, В.Б. Петров, А.И. Шапошников, Л. В. Кравченко // Сельскохозяйственная биология. – 2011. – № 3. – С. 119–122.
6. Багаутдинова Г. Г. Влияние биопрепарата «Метаболит» на биологическую активность чернозема выщелоченного, устойчивость и продуктивность сельскохозяйственных растений в условиях нефтяного загрязнения / Г. Г. Багаутдинова // Автореф. дис. на соискание учен. степ. канд. биол. наук. – Уфа, 2011. – 20 с.
7. Сираева З. Ю. Биопрепарат для стимуляции роста и защиты растений от болезней на основе *Bacillus amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 / З. Ю. Сираева // Автореф. дис. на соискание учен. степ. канд. биол. наук. – Казань, 2012. – 20 с.

8. Ржевская В. С. Изучение биологических свойств молочнокислых бактерий / В. С. Ржевская, И. П. Отурина Л. М. Теплицкая // Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского. Сер. Биология, химия. – 2014. – Т. 27 (66). – №1. – С. 145–160.
9. Ржевская В. С. Влияние микробиологического препарата «Эмбико®» на урожайность яблони сорта Голден Делишес / В. С. Ржевская, Н. В. Алейникова, Е. С. Галкина // Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин і мікроорганізмів : матеріали XII конференції молодих вчених. – Київ, 15–16 листопада 2012. – С. 291-293.
10. Ржевская В. С. Влияние микробиологического удобрения «Эмбико» на урожайность винограда сорта Кардинал / В. С. Ржевская // Мікробні біотехнології : актуальність і майбутнє – Radostim-2012 : матеріали між. науч.-практ. конф. – Київ, 19–22 листопада 2012. – С. 269–271.
11. Ржевская В. С. Колонизация ризопланы корней огурцов микроорганизмами, входящими в состав микробного препарата «Эмбико®» / В. С. Ржевская, Л. М. Теплицкая, И. П. Отурина // Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, медицина. – 2013. – Т. 4(2). – С. 63–70.
12. Методическое пособие по почвенной микробиологии / Сост. Т. И. Боровикова. – Кривой Рог : Изд-во «И.В.И.», 2003. – 68 с.
13. Теппер Е. З. Практикум по микробиологии // Е.З. Теппер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева. – М. : Агропромиздат, 1987. – 239 с.
14. Солдатова С. С. Роль сидерации и соломы в формировании экологически устойчивых агробиоценозов в южно-таежной зоне / С. С. Солдатова // Автореф. дис. на соискание учен. степ. канд. биол. наук. – Москва, 2011. – 20 с.
15. Хазиев В. П. Методы почвенной энзимологии / В. П. Хазиев. – М. : Наука, 2005. – 252 с.
16. Ивантер Э.В. Элементарная биометрия. Учебное пособие / Э.В. Ивантер, А.В. Коросов. – Петрозаводск : Изд-во ПетрГУ, 2010. – 104 с.
17. Полянская Л. М. Стимуляция роста растений культурами *Beijerinckia* и *Clostridium* / Л. М. Полянская, О. Т. Вердина, Л. В. Лысак, Д. Г. Звягинцев // Микробиология, – 2002, том 71, № 1. – С. 123–129.
18. Хрянин В.Н. Роль фитогормонов в дифференциации пола у растений / В.Н. Хрянин // Физиология растений. – 2002. – Т. 49. – С. 608–614.
19. Егоров И.В. Действие регуляторов роста, выделенных из пшеницы, на генеративное развитие растений / И.В. Егоров // Автореф. дис. на соискание учен. степ. канд. биол. наук. – Москва, 1983. – 20 с.
20. Коць С. Я. Мінеральні елементи і добрива в живленні рослин / С. Я. Коць, Н. В. Петерсон. – К. : Логос, 2009. – 182 с.
21. Robertson K. Nitrous oxide emission from soil: On extrapolation from soil environmental factors / K. Robertson // Linköping University. – 1995. – P. 9-44.
22. Wagner D.M. Methane production in aerated marshland and model soils effects of microflora and soil texture / D.M. Wagner, E-M. Pfeiffer, E. Bock // Soil Biology and Biochemistry, – 1999. – V. 31. – P. 999-1006.
23. Умер Мустафа Исмаил. Микробиологическая активность на поверхности и внутри почвенных агрегатов / Умер Мустафа Исмаил, А. А. Ванькова // Известия ТСХА. – 2011. – Вып. 6. – С. 78–83.

## THE INFLUENCE OF MICROBIAL PREPARATION EMBIKO® ON FRUITIFICATION OF CUCUMBER AND SOIL BIOLOGICAL ACTIVITY

*Rzhevskaya V.S.<sup>1</sup>, Oturina I.P.<sup>1</sup>, Bulygin S.V.<sup>2</sup>, Teplitskaya L.M.<sup>1</sup>*

*Tavrida National V.I. Vernadsky University, Simferopol, Russia*

*CLL «Pension «Orbita-2», Yevpatoriia, Russia*

*E-mail: viktoryar45@mail.ru*

The influence of microbial preparation Embiko®, which is composed of lactic acid bacteria, purple non-sulfur bacteria, saccharomyces and products of their metabolism, on

growth and fruitification of the cucumber sorts Competitor and Phoenix plus, and hybrid Pasalimo F1 was studied. The results of experiments on the effectiveness of treatment F1 hybrid Pasalimo microbial drug inserting it into the soil with irrigation water showed that Embiko® weakly stimulates growth of cucumber's vegetative organs (shoots and leaves), and doesn't affect the processes of its fruitification.

Spraying the cucumber sorts Phoenix plus and Competitor by microbial preparation Embiko® in dilution of 1: 500 in phase of two leaves and in the flowering period twice increased their yield only by 8,3 and 19,2 %. After spraying plants in phase of five true leaves once, the yield increased by 42,4 and 60,2 %, respectively, when compared with the control group.

Combined treatment of cucumber plants (entering the irrigation water and double spraying in phase of five true leaves and during the flowering period) increased the yield of the sort Competitor by 66,2 % compared with the control group.

When the soil was watered with microbial preparation Embiko®, there was discovered a tendency of enrichment of natural soil microbial coenosis with the agronomically useful groups of microorganisms: ammonifying number increased by 66,7 %, nitrifying bacteria – by 50,0 %, Azotobacter – by 26,8 %, oligonitrophilic – 64,3 %, while the phosphate mobilizer microorganisms by 34,3 times when compared with the control group. Anaerobic nitrogen-fixers and denitrifying bacteria in the soil samples were not found at the end of the growing season that could be a result of the improvement of the soil aeration mode.

Using Embiko® for crop irrigation creates favorable conditions for the functioning of complex cellulose degraders microorganisms – micromycetes (species of the genus *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor*) and cellulolytic bacteria: in the experimental group the number of the microscopic fungi increased by 8,0 times compared with the control group.

The soil after being watered with Embiko® became more finely structured, thus, its physical and chemical properties improved: water sorption was increased and soil aeration mode was optimized.

The usage of Embiko® increased the level of enzyme activity in the soil at the end of the growing season: catalase activity in soil samples increased by 36,7 %, and dehydrogenase activity – by 40,6 %. It's an indicator of the high level of physiological activity in the soil microflora, which determines the level of soil fertility.

**Keywords:** microbial preparations Embiko®, cucumbers, growth processes, yield, soil enzymatic activity.

#### References

1. Orlova O. V. Improving of the soil fertility by activating the soil microflora, adjustable biofertilizers, *Agricultural biology*, **3**, 94–97 (2011).
2. Petrov V. B. Microbiological preparations in practical plant growing in Russia: function, efficiency, prospects, *Market AIC*, **7**, 16-18 (2009).
3. Sidorenko O. D. Prospects for the use of biological preparations based on microorganisms, *News TAA*, **6**, 70–79 (2012).
4. Fatina P. N. The use of microbiological preparations in agriculture, *Herald Astrakhan State Technical University*, **4** (39), 133 – 136 (2007).

5. Chebotar V. K. Biochemical criteria for evaluation agronomically important properties of bacilli used in the creation of microbiological preparations, *Agricultural biology*, **3**, 119–122 (2011).
6. Bagautdinova G. G. The influence of biopreparation "Metabolite" on biological activity of leached chernozem, sustainability and productivity of agricultural plants in the oil pollution. Avtoref. dis. for the scientific degree of the kand. biol. sciences, 20 p. (Ufa, 2011).
7. Siraeva Z. Yu. Biopreparation for stimulate of the plant's growth and protect from diseases based on *Bacillus amyloliquefaciens* BRPM B-11008/ Z. Yu. Siraeva // Avtoref. dis. for the scientific degree of the kand. biol. sciences, 20 p. (Kazan, 2012).
8. Rzhetskaya V. S. The study of the biological properties of lactic acid bacteria, *Scientific notes of the Taurida National V.I. Vernadsky University. Ser. Biology, Chemistry*, **27 (66)**, 1, 145–160 (2014).
9. Rzhetskaya V. S. Effect of microbiological preparation "Embiko®" on yield of the apple sorts Golden Delicious. Research, applied and educational aspects of physiology, genetics, biotechnology of the plant and microorganisms: Materials XII Conference of Young Scientists, 291-293 (Kiev, 15–16.11.2012).
10. Rzhetskaya V. S. Effect of microbiological fertilizer "Embiko" to yield of the grapes sort Cardinal, *Microbial Biotechnology: current and future - Radostim-2012: Materials Int. Scientific – Pract. Conf.*, 269–271 (Kiev, 19–22.11. 2012).
11. Rzhetskaya V. S. Colonization of rizoplane cucumber roots microorganisms as a part of the microbial preparation "Embiko®", *Herald of Dnipropetrovsk University. Biology, Medicine*, **4(2)**, 63–70 (2013).
12. Methodical manual for soil microbiology / T. I. Borovikova, 68 p. (Krivoy Rog, I.B.I., 2003).
13. Tepper E. Z. Practicum on Microbiology, 239 p. (Agropromizdat, 1987).
14. Soldatova S. S. The role of green manuring and straw in the formation of sustainable agrobiocenoses in the southern taiga zone. Avtoref. dis. for the scientific degree. kand. biol. sciences, 20 p. (Moscow, 2011).
15. Haziev V. P. Methods of Soil Enzymology, 252 p. (Nauka, 2005).
16. Ivanter E. V. Elementary biometrics. Study Guide, 104 p. (Petrozavodsk : PetrNU, 2010).
17. Polyanskaya L. M. Stimulation of plant growth by cultures *Beijerinckia* and *Clostridium*, *Microbiology*, **71**, 1, 123–129 (2002).
18. Hryanin V.N. The role of phytohormones in sex differentiation in plants, *Plant Physiology*, **49**, 608–614 (2002).
19. Egorov I.V. The action of growth regulators isolated from wheat, in the generative development of plants. Avtoref. dis. for the scientific degree. kand. biol. sciences, 20 p. (Moscow, 1983).
20. Kots S. Ya. Minerals and fertilizers in plant nutrition, 182 p. (Logos, 2009).
21. Robertson K. Nitrous oxide emission from soil: On extrapolation from soil environmental factors, *Linköping University*, 9–44 (1995).
22. Wagner D.M. Methane production in aerated marshland and model soils effects of microflora and soil texture, *Soil Biology and Biochemistry*, **31**, 999–1006 (1999).
23. Umer Mustafa Ismail, Vankova A. A. Microbial activity on the surface and within the soil aggregates, *News TAA*, **6**, 78–83 (2011).

Поступила в редакцию 27.09.2014 г.

**УДК 58.01:581.46:582.734.4**

## **АНАТОМО-МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛЕПЕСТКОВ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *ROSA* L**

*Семенова Е.Ф.<sup>1</sup>, Теплицкая Л.М.<sup>2</sup>, Преснякова Е.В.<sup>1</sup>, Меженная Н.А.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Медицинский институт, Пензенский государственный университет, Пенза, Россия*

<sup>2</sup>*Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Россия*

*E-mail: sefl1957@mail.ru*

Проведённые исследования позволили установить локализацию эфирного масла, выявить взаимосвязи между содержанием эфирного масла, окраской лепестков и числом хромосом, а также показали, что характер расположения секреторных структур, их размеры и количество являются видо- и формоспецифичными.

**Ключевые слова:** виды и формы розы, окраска лепестков, эндогенные и экзогенные секреторные структуры, эфирное масло, хромосомные числа.

### **ВВЕДЕНИЕ**

Розы возделываются во многих странах в бесчисленном множестве сортов как в качестве декоративных растений, так и в довольно обширных размерах со строго промышленной целью [1]. Цветки отличаются приятным ароматом, обусловленным содержанием в их лепестках эфирного масла. Представляет интерес изучение анатомического строения лепестков различных видов и форм роз с целью выявления особенностей расположения секреторных структур для диагностики эфирномасличного сырья и интенсификации технологических процессов.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Объектами изучения служили 10 видов и 11 гибридных форм розы эфирномасличной (табл. 1).

Исследования проводились на растениях, выращенных на коллекционных участках (поселок Крымская Роза Белогорского района Республики Крым), расположенных в северной предгорной части Крымского полуострова. Также изучались образцы, полученные в условиях Ботанического сада им. И.И. Спрыгина (г. Пенза).

Растительный материал фиксировали в ацеталкоголе (1:3) и 6% формалине; поперечные срезы готовились бритвой от руки по общепринятой методике [3, 4]. Изучение проводили с помощью светового микроскопа МИКМЕД-1 при 10-, 40-кратном увеличении. Описания микропрепаратов составлены в соответствии с современной методической и справочной литературой [4, 5]. Фотографирование

микро- и макрообъектов проводили цифровыми фотокамерами NikonCoolpix 2500, NikonCoolpix 6300, Panasonic DMC-FX100 с объективом Lumix 12 megapixels.

Для количественного определения эфирного масла в лепестках использовали методику, изложенную в Государственной фармакопее (ГФ XI) [6]. Математическая обработка данных проводилась по В.М. Шмидту (1984) и Г.Ф. Лакину (1990), уровень значимости  $p=0,95$ .

Таблица 1.

Виды и формы розы эфирномасличной [по 2, 3]

Название	Происхождение	Надвидовой таксон-секция
Белая	<i>Rosa alba</i> L.	<i>Gallicae</i> Crep.
Лань	<i>Rosa alba</i> L. x ( <i>R. damascena</i> Mill. x <i>R. gallica</i> L.)	<i>Gallicae</i> Crep.
Мичуринка	<i>R. damascena</i> Mill. x <i>R. gallica</i> L.	<i>Gallicae</i> Crep.
Украина	<i>R. damascena</i> Mill. x <i>R. gallica</i> L.	<i>Gallicae</i> Crep.
Фестивальная	<i>R. damascena</i> Mill. x <i>R. gallica</i> L.	<i>Gallicae</i> Crep.
Кооператорка	<i>R. damascena</i> Mill. x <i>R. gallica</i> L.	<i>Gallicae</i> Crep.
Казанлыкская	<i>R. damascena</i> f. <i>trigintipetala</i> (Dieck.) R. Keller	<i>Gallicae</i> Crep.
Крымская Красная	<i>R. gallica</i> L.	<i>Gallicae</i> Crep.
Весна	<i>R. damascena</i> Mill. x <i>R. gallica</i> subsp. <i>Eriosila</i> Kell. var. <i>Austriaca</i> Br.	<i>Gallicae</i> Crep.
Радуга	<i>R. gallica</i> subsp. <i>Eriosila</i> Kell. var. <i>Austriaca</i> Br. x <i>R. gallica</i> L.	<i>Gallicae</i> Crep.
Гибрид 7806	<i>R. gallica</i> subsp. <i>Eriosila</i> Kell. var. <i>Austriaca</i> Br. x <i>R. gallica</i> L.	<i>Gallicae</i> Crep.
Таврида	<i>R. damascena</i> Mill. x неизвестн.	<i>Gallicae</i> Crep.
Кавказская Красная	<i>R. gybrida</i>	<i>Gallicae</i> Crep.
Гибрид М-215	<i>R. gybrida</i>	<i>Gallicae</i> Crep.
Роза моховая	<i>R. centifolia</i> L. f. <i>muscosa</i>	<i>Gallicae</i> Crep.
Роза желтая	<i>R. lutea</i> Mill. ( <i>R. foetida</i> Herrm.)	<i>Lutea</i> Crep.
Прима Красная	<i>R. rugosa</i> Thunb.	<i>Cinnatomeae</i> Crep.
Роза морщинистая	<i>R. rugosa</i> Thunb.	<i>Cinnatomeae</i> Crep.
Роза коричная (Р. майская)	<i>R. cinnatomea</i> L. ( <i>R. majalis</i> Herrm.)	<i>Cinnatomeae</i> Crep.
Роза собачья	<i>R. canina</i> L.	<i>Caninae</i> Dc.
Роза одесская	<i>R. odessiana</i> Hort.	<i>Caninae</i> Dc.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Цветки розы имеют 5...90 и более лепестков, их масса достигает 8 г. Форма их, как правило, обратнoсердцевидная. Окраска венчика различных оттенков розовая: Мичуринка, Фестивальная, Таврида, Кооператорка, Лань, Украина, Весна, Радуга, *R. hybrida* 7806, *R. damascena f. trigintipetala* (Dieck.) R. Keller, *R. cinnatomea* L., *R. canina* L., *R. odessiana* Hort.; красная: Крымская Красная, Кавказская Красная, Прима Красная, *R. hybrida* М-215, *R. centifolia* L. f. *muscosa*, *R. rugosa* Thunb.; белая *R. alba* L. или желтая *R. lutea* Mill. Тип цветка простой: *R. canina* L., *R. rugosa* Thunb., *R. cinnatomea* L., *R. odessiana* Hort.; полумахровый: *R. damascena f. trigintipetala* (Dieck.) R. Keller, *R. lutea* Mill., *R. alba* L., Прима Красная, Кооператорка; махровый: Радуга, Таврида, Весна, Лань, Фестивальная, Мичуринка, *R. hybrida* М-215; густомахровый: Украина, Кавказская Красная, Крымская Красная, *R. centifolia* L. f. *muscosa*, *R. hybrida* 7806 (рис.1, табл.2, 3).

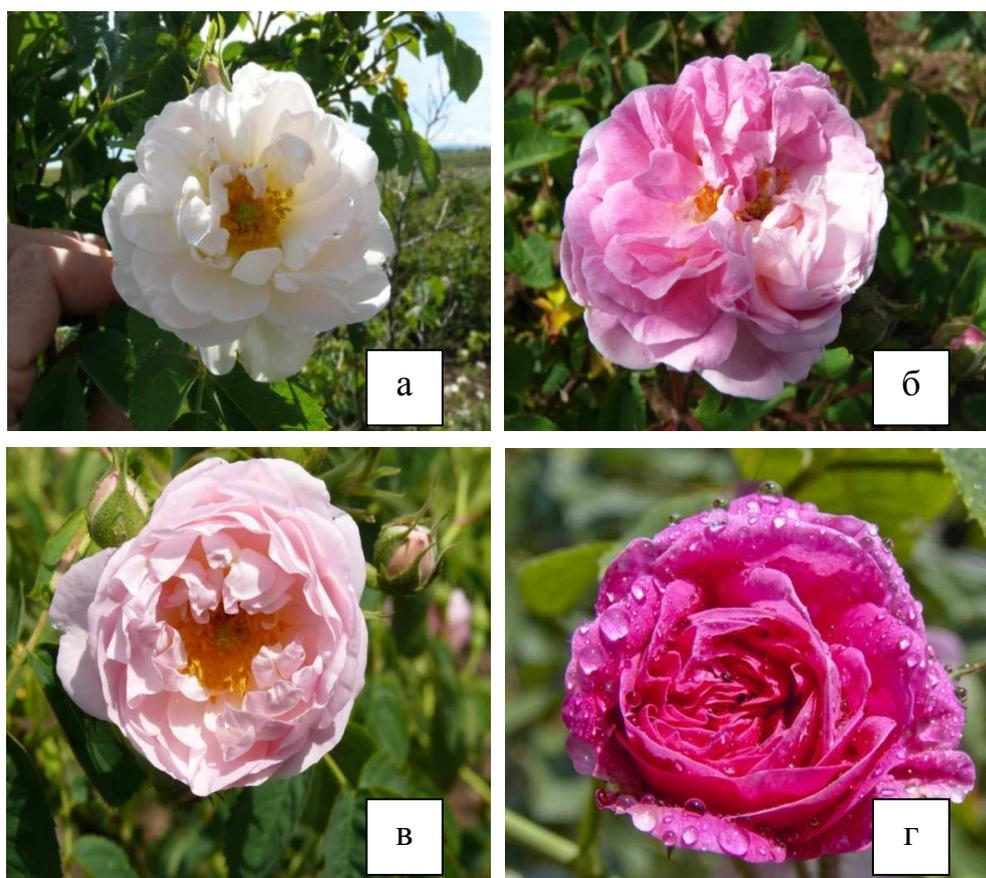


Рис.1. Морфологическая структура цветков эфирномасличной розы в момент их раскрытия: а – полумахровый (*R. alba* L.); б, в – махровый (Мичуринка, Лань); г – густомахровый (Украина).

Результаты анатомического изучения лепестков видов и форм роз показали, что клетки верхнего эпидермиса многоугольные, нижнего имеют слабоизвилистые контуры стенки. Устьица располагаются преимущественно с нижней стороны лепестка, мелкие. На поперечном срезе лепестка (рис. 2) видно, что снаружи он покрыт таблитчатыми клетками эпидермиса, плотно прилегающими друг к другу и покрытыми штриховатой кутикулой. Клетки верхнего эпидермиса вытягиваются в сосочки конусовидной формы. Имеется плотная продольно-морщинистая кутикула. Содержимое клеток эпидермальной ткани окрашено, за счет содержания хромопластов.

Под эпидермисом располагается паренхимная ткань, состоящая из 4-12 слоев неокрашенных клеток с тонкими оболочками округлой или неправильной формы, образующих большое количество межклетников. Механическая ткань отсутствует. Проводящая ткань представлена спиральными трахеидами в паренхимной обкладке, состоящей из мелких плотно примыкающих друг к другу клеток.

**Таблица 2.**  
**Морфометрические характеристики цветков изучаемых видов и форм розы (шиповника)**

Название	Количество в цветке, штук			
	лепестков	тычинок	пестиков	элементов суммарно
<i>R. canina</i> L.	5 $\pm$ 0	74 $\pm$ 2	32 $\pm$ 1	111 $\pm$ 2
<i>R. odessiana</i> Hort.	5 $\pm$ 0	76 $\pm$ 3	25 $\pm$ 1	106 $\pm$ 3
<i>R. alba</i> L.	48 $\pm$ 2	49 $\pm$ 4	40 $\pm$ 3	137 $\pm$ 5
<i>R. hybrida</i> M-215	77 $\pm$ 6	45 $\pm$ 6	35 $\pm$ 4	157 $\pm$ 7
<i>R. cinnatomea</i> L.	5 $\pm$ 0	61 $\pm$ 4	38 $\pm$ 2	114 $\pm$ 4
<i>R. rugosa</i> Thunb.	5 $\pm$ 0	57 $\pm$ 8	27 $\pm$ 8	89 $\pm$ 9
Кавказская Красная	156 $\pm$ 6	1 $\pm$ 1	55 $\pm$ 3	213 $\pm$ 9
Украина	107 $\pm$ 4	61 $\pm$ 4	18 $\pm$ 2	186 $\pm$ 5
Крымская Красная	94 $\pm$ 3	51 $\pm$ 3	29 $\pm$ 2	174 $\pm$ 5
Весна	64 $\pm$ 4	76 $\pm$ 4	27 $\pm$ 1	167 $\pm$ 6
Прима Красная	29 $\pm$ 1	208 $\pm$ 5	161 $\pm$ 3	398 $\pm$ 8
<i>R. centifolia</i> L. f. <i>muscosa</i>	96 $\pm$ 7	5 $\pm$ 2	19 $\pm$ 3	120 $\pm$ 7
Таврида	64 $\pm$ 5	78 $\pm$ 5	20 $\pm$ 3	162 $\pm$ 6
Кооператорка	27 $\pm$ 1	136 $\pm$ 3	38 $\pm$ 3	201 $\pm$ 5
Лань	61 $\pm$ 5	92 $\pm$ 8	43 $\pm$ 2	197 $\pm$ 6
Фестивальная	71 $\pm$ 2	50 $\pm$ 4	35 $\pm$ 2	156 $\pm$ 2
Радуга	56 $\pm$ 2	80 $\pm$ 5	25 $\pm$ 1	161 $\pm$ 3
<i>R. lutea</i> Mill.	25 $\pm$ 0	39 $\pm$ 4	25 $\pm$ 2	89 $\pm$ 5
<i>R. damascena</i> f. <i>trigintipetala</i> (Dieck.) R. Keller	36 $\pm$ 2	78 $\pm$ 1	29 $\pm$ 1	143 $\pm$ 2
<i>R. hybrida</i> 7806	89 $\pm$ 8	38 $\pm$ 7	35 $\pm$ 5	160 $\pm$ 9
Мичуринка	75 $\pm$ 4	42 $\pm$ 3	32 $\pm$ 3	149 $\pm$ 4

Таблица 3.

Сравнительная характеристика изучаемых видов и форм розы

Название	Число хромосом	Окраска лепестков	Тип цветка	Содержание эфирного масла (МДЭМ), %
<i>R. canina</i> L.	35	Бледно-розовая	простой	0,0435
<i>R. odessiana</i> Hort.	35	Бледная с розовым основанием	простой	0,0487
<i>R. alba</i> L.	28	Белая	полу-махровый	0,0518
<i>R. hybrida</i> M-215	-	Ярко-красная	полу-махровый	0,0544
<i>R. cinnamomea</i> L.	14	Розовая	простой	0,0702
<i>R. rugosa</i> Thunb.	14	Красная	простой	0,0767
Кавказская Красная	21	Ярко-красная	густо-махровый	0,0787
Украина	21	Бледно-розовая	густо-махровый	0,0839
Крымская Красная	28	Ярко-красная	махровый	0,0865
Весна	28	Розовая	полу-махровый	0,0994
Прима Красная	14	Красная	полу-махровый	0,1092
<i>R. centifolia</i> L. f. <i>muscosa</i>	28	Темно-красная	густо-махровый	0,1148
Таврида	-	Бледно-розовая	махровый	0,1200
Кооператорка	28	Розовая	полу-махровый	0,1233
Лань	-	Бледно-розовая	махровый	0,1275
Фестивальная	-	Розово-красная	махровый	0,1357
Радуга	-	Розово-красная	махровый	0,1380
<i>R. lutea</i> Mill.	28	Желтая	полу-махровый	0,1413
<i>R. damascena</i> f. <i>trigintipetala</i> (Dieck.) R.Keller	28	Бледно-розовая	полу-махровый	0,1528
<i>R. hybrida</i> 7806	-	Ярко-розовая	махровый	0,1640
Мичуринка	-	Розовая	махровый	0,1852

В лепестках имеются экзогенные выделительные структуры – железистые пятна, представляющие собой мелкокапельные скопления эфирного масла под кутикулой эпидермиса, вызывающие ее отслаивание. Они вырабатываются отдельными группами выделительных клеток, разбросанных в эпидермальной ткани. Эндогенные секреторные структуры – эфирномасличные вместилища, расположенные в толще паренхимной ткани, овальной формы, содержат капли эфирного масла. Эти данные согласуются с выявленными ранее для сорта Крымская Красная, относящегося к розе французской *R.gallica* L. (рис.2) и важны для прогнозирования первичной переработки конкретных видов и форм, интенсификации технологических процессов [9].

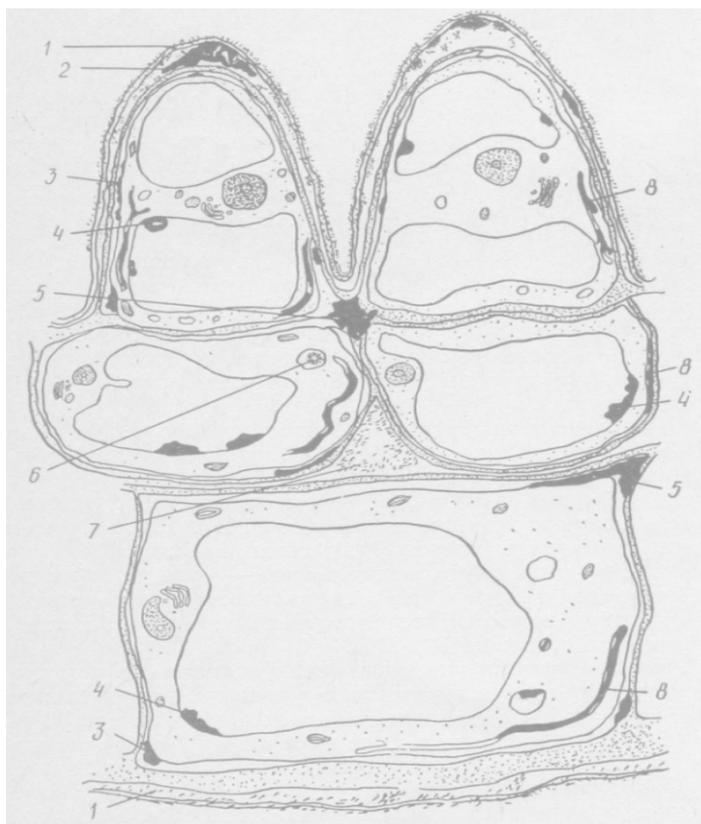


Рис. 2. Схема строения лепестка розы и локализации эфирного масла и воска [9].

Восковые отложения: 1 – на кутикуле; 2 – в пространстве между клеточной оболочкой и кутикулой; 6 – в вакуолях; 7 – в межклетниках

Эфирное масло: 2 – в пространстве между клеточной оболочкой и кутикулой; 3 – в экстраплазматическом пространстве (между оболочкой и плазмалеммой); 4 – в вакуолях; 5 – в межклетниках; 8 – в межмембранном пространстве эндоплазматического ретикулума.

Микроморфологические особенности изученных видов и форм представлены ниже (рис. 3, 4).

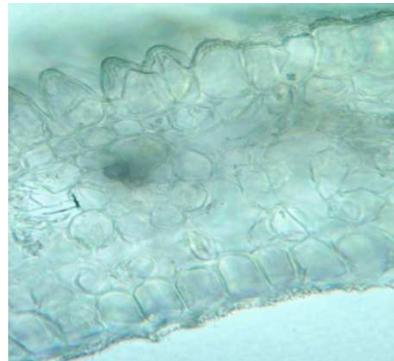
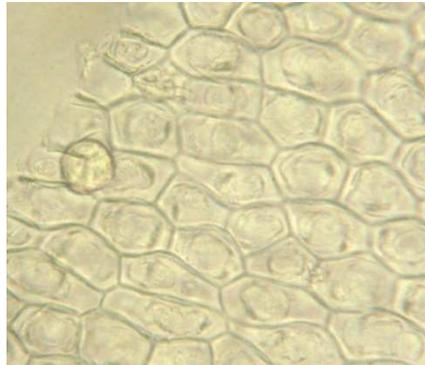
*R. cinnamomea* L. Эпидермальные клетки верхней стороны лепестка многоугольные, образуют сосочковидные выросты с утолщенной наружной стенкой. С нижней стороны эпидермальные клетки изодиаметрической формы с штриховатой кутикулой, по размеру не отличающиеся от клеток верхнего. Паренхимные клетки расположены в 4-6 слоев. Эфирососуды крупные, округлые, располагающиеся участками, нечасто, близко к поверхности.

*R. canina* L. Клетки верхнего эпидермиса мельче или равны нижнему. Кутикула у изодиаметрических клеток эпидермиса волнистая. Паренхимные клетки располагаются в 6-8 слоев, межклетников меньше. Эндогенные вместилища мелкие, находятся в глубине паренхимы. Заметны железистые пятна в сосочковом слое.

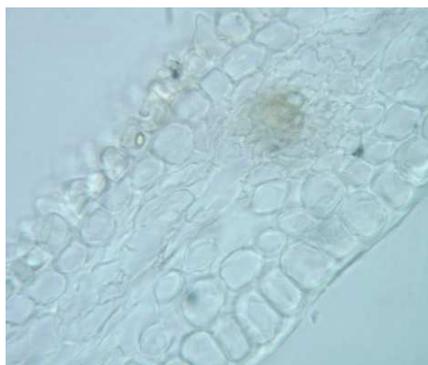
*R. odessiana* Hort. Анатомическое строение лепестка схоже с *R. cinnamomea* L. Эндогенные вместилища располагаются относительно равномерно по всей площади, некрупные. Заметны экзогенные выделительные структуры в сосочковом слое.

*R. rugosa* Thunb. Клетки верхнего эпидермиса овальной, слегка вытянутой формы, окрашены, по размерам не отличаются от нижних эпидермальных клеток. Паренхимные клетки располагаются в 7-10 слоев. Имеются крупные редкие эндогенные вместилища, находящиеся в толще паренхимы. Проводящие элементы представлены трахеидами, располагающимися группами по 8-10 или по 3-4.

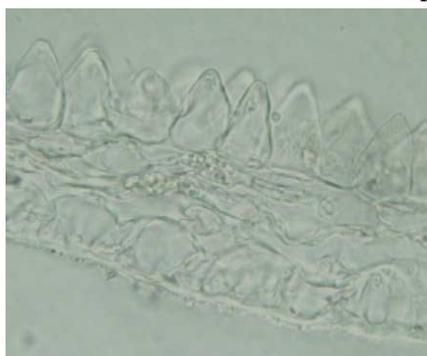
*R. alba* L. Сосочковидные клетки сильно заостренные, по размерам меньше или равные клеткам верхнего эпидермиса. Эпидермальные клетки не окрашены. Паренхима состоит из 8-12 слоев клеток овальной формы. Эндогенные вместилища крупные, располагаются редко, близко к поверхности. Хорошо заметны железистые пятна в сосочковом слое и слое нижнего эпидермиса.



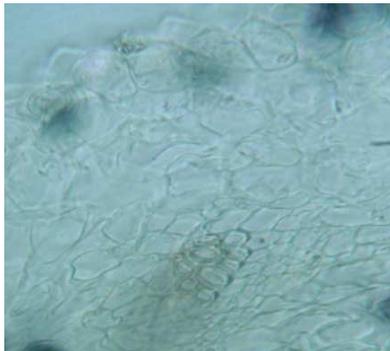
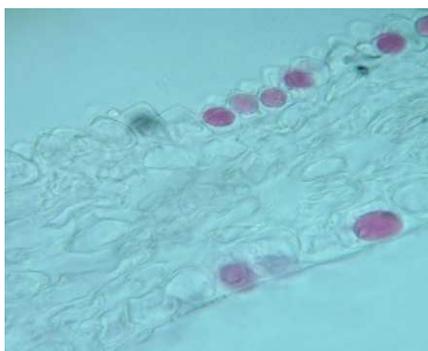
*R. cinnamomea* L.



*R. canina* L.

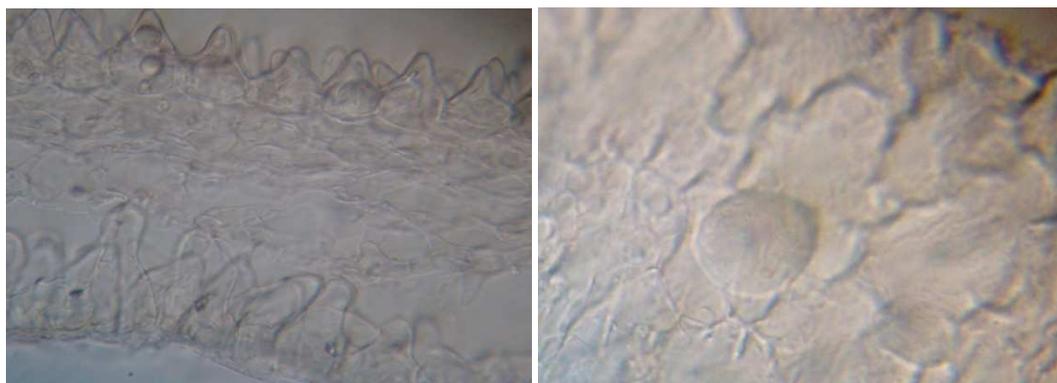


*R. odessiana* Hort.

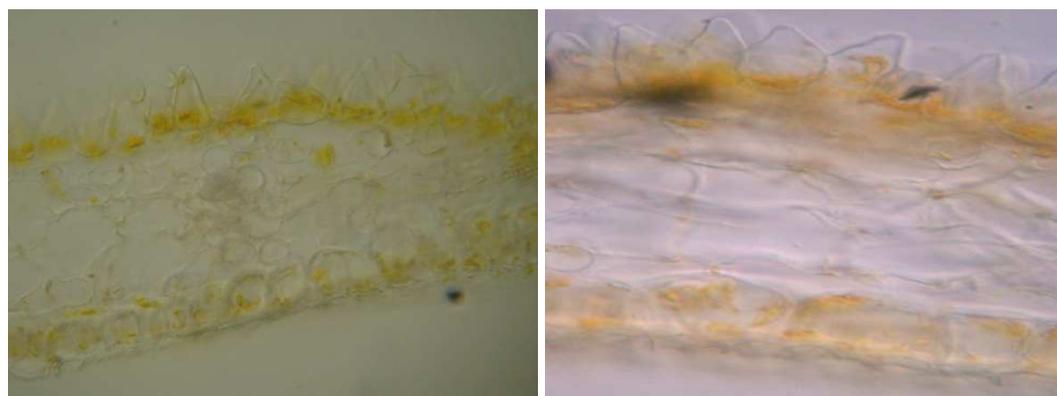


*R. rugosa* Thunb.

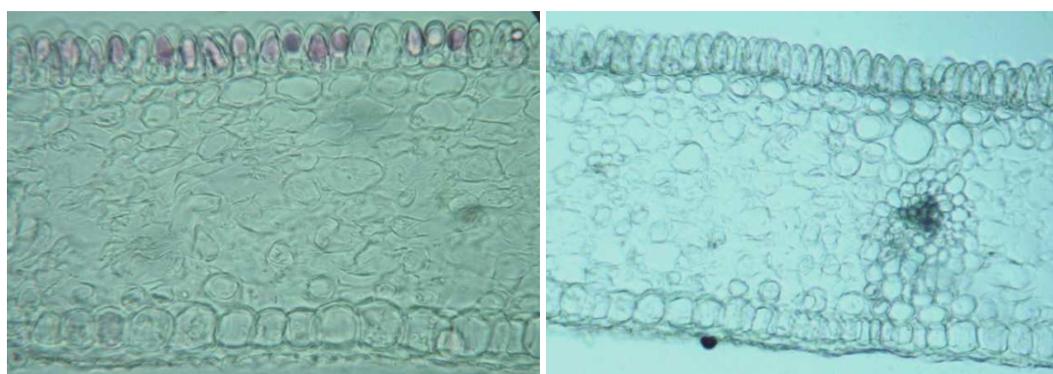
Рис. 3. Поперечные срезы лепестков шиповников.



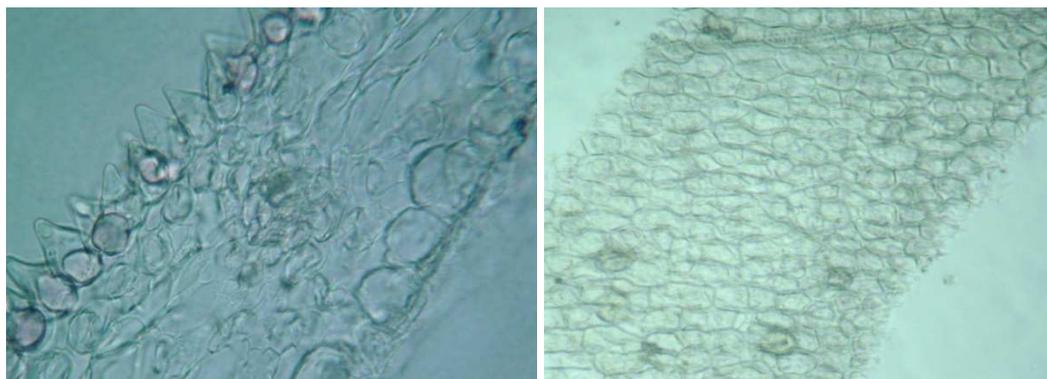
*R. alba* L.



*R. lutea* Mill.



*R. gallica* L.



*R. gallica var. centifolia* L.

Рис.4. Поперечные срезы лепестков видов и форм роз.

*R. lutea* Mill. Эпидермальные клетки окрашены в желто-оранжевый цвет. Сосочкообразные клетки заострены, равны или чуть более крупные, чем клетки нижнего эпидермиса. Паренхимные клетки располагаются в 3-5 слоев, много межклетников. Эндогенные вместилища находятся близко к нижнему эпидермису.

*R. gallica* L. Эпидермальные клетки окрашены. Сосочкообразные клетки не заостренные, плотно примыкают друг к другу, несколько меньше или равные изодиаметрическим клеткам нижнего эпидермиса. Паренхима составлена 10-12 слоями клеток. Эндогенные вместилища мелкие, овальные, располагаются равномерно в глубине паренхимы лепестка. Проводящие элементы представлены трахеидами, располагающиеся группами по 8-10 или по 3-4.

*R. gallica var. centifolia* L. (*R. centifolia* L.) Клетки эпидермиса окрашены в розово-фиолетовый цвет. Сосочкообразные клетки крупнее, либо равны клеткам нижнего эпидермиса, имеют сильно утолщенную наружную стенку. Клетки паренхимы располагаются в 4-5 слоев, лепесток тонкий. Проводящие элементы находятся ближе к наружному эпидермису. Имеется два типа выделительных структур. Эндогенные вместилища овальной формы, не крупные (по размеру как паренхимные клетки), располагающиеся в 2-3 слое паренхимы. Выделительные пятна находятся в сосочковидных клетках.

Проведенный анатомо-морфологический анализ расширенного набора образцов позволяет подтвердить выделенные нами ранее [10] диагностические признаки эфирномасличного сырья розы:

- размеры клеток верхнего и нижнего эпидермиса,
- окраска эпидермальных клеток,
- форма клеток верхнего эпидермиса,
- число слоев паренхимных клеток,
- характер расположения вместилищ.

В результате определения содержания эфирного масла в лепестках, обнаружено, что наибольшими показателями характеризовались коллекционные образцы Мичуринка, Радуга, Фестивальная, *R. hybrida* 7806, *R. damascena f. trigintipetala* (Dieck.) R.Keller, *R. lutea* Mill., относящиеся к секциям *Gallicae* Crep. и

*Lutea* Стер. Наименьшее содержание эфирного масла характерно для видов розы: *R. canina* L., *R. odessiana* Hort., *R. alba* L. Отмечена тенденция: чем ниже массовая доля эфирного масла в расчете на сырую массу лепестков, тем в более глубоком слое расположены эфирносные вместилища, встречающиеся редко и отличающиеся мелкими размерами.

Хромосомные числа представителей рода *Rosa* варьируют от 14 до 56, составляя, таким образом, полиплоидный ряд с основным числом хромосом 7. В литературных источниках имеются сведения, что различный уровень плоидности не коррелирует с содержанием эфирного масла к моменту раскрытия цветка [1]. Однако, полученные экспериментальные данные свидетельствуют, что массовая доля эфирного масла у диплоидных и тетраплоидных форм и видов, как правило, выше по сравнению с триплоидными и пентаплоидными (табл. 3).

Прослеживается тенденция увеличения массовой доли эфирного масла у образцов с розовыми и желтыми лепестками цветков по сравнению с красными и белыми, что согласуется с литературными данными [1, 2].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Результаты исследований позволяют определить диагностические анатомические признаки лепестков роз разных видов и форм, к которым относятся: размеры клеток верхнего и нижнего эпидермиса, окраска эпидермальных клеток, форма клеток верхнего эпидермиса, число слоев паренхимных клеток и характер расположения вместилищ.
2. Секреторные структуры у видов и форм роз различных направлений использования (декоративных, эфирномасличных, витаминных шиповников) представлены эндогенными вместилищами овальной формы, расположенными в толще паренхимной ткани и содержащими капли эфирного масла; и экзогенными выделительными структурами – железистыми пятнами, представляющими собой мелкокапельные скопления эфирного масла под кутикулой эпидермиса.
3. Показано, что расположение секреторных структур, их размеры и количество видо- и формоспецифичны. Мелкие эфирносные вместилища, отличающиеся глубоким расположением в толще ткани лепестка преимущественно характерны для образцов с низким содержанием эфирного масла.
4. Проведенный анализ позволил выявить взаимосвязи между содержанием эфирного масла, окраской лепестков и числом хромосом: наблюдается тенденция увеличения массовой доли эфирного масла у желто- и розоволепестковых форм и видов, уровень плоидности которых кратен  $2n$ .
5. Полученные данные по анатомическому строению лепестков видов и форм роз различных направлений использования представляют интерес для интродукционно-селекционной работы в качестве маркерных признаков, для диагностики эфиромасличного сырья, в частности, в разрабатываемых фитосборах (фиточаях), другой фармацевтической и пищевой продукции [11 - 13], а также для интенсификации технологических процессов его первичной переработки.

Список литературы

1. Назаренко Л.Г. Культура эфиромасличной розы / Назаренко Л.Г., Миньков Б.П. и др. под ред. Мустьяц Г.И., Мурина А.В. – Кишинев: Штиинца, 1983. – 186 с.
2. Назаренко Л.Г. Роза эфиромасличная (история, биологические особенности и селекция). / Назаренко Л.Г. – Киев: Наукова думка, 1978. – 200 с.
3. Семенова Е.Ф. Практикум по ботанике. / Семенова Е.Ф., Меженная Н.А., Фадеева Т.М. – Пенза: Изд-во ПГУ, 2012. – 162 с.
4. Самылина И.А. Фармакогнозия. Атлас. / И.А. Самылина, О.Г. Аносова– М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – Т.1. – 192 с.
5. Лотова Л.И. Морфология и анатомия высших растений. / Лотова Л.И. – М.: Эдиториал УРСС, 2000. – 528 с.
6. Государственная Фармакопея СССР XI издания. – М.: Медицина, 1989. – Вып.1 – 336 с.
7. Шмидт В.М. Математические методы в ботанике. / Шмидт В.М. – Л.: Изд. Ленингр. ун-та, 1984. – 288с.
8. Лакин Г.Ф. Биометрия. / Лакин Г.Ф. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
9. Бугорский П.С. Микроморфологические параметры цветов розы / П.С. Бугорский, А.М. Бугара, Л.М. Теплицкая // Масложировая промышленность – 1985. – № 7. – С. 23-25.
10. Семенова Е.Ф. Микроморфологические особенности лепестков розы / Е.Ф. Семенова, Н.А. Меженная // Университетское образование. – Пенза: Изд-во ПГУ, 2013.– Вып. 17. – С.430-431
11. Семенова Е.Ф. Фармакогностические аспекты разработки препаратов на основе жирномасличного и эфирномасличного сырья / Е.Ф. Семенова // Материалы I Международной научно-практической конференции «Современные проблемы отечественной медико-биологической и фармацевтической промышленности. Развитие инновационного и кадрового потенциала Пензенской области». – Пенза: ПГУ, 2011. – С. 73-77.
12. Семёнова Е.Ф. Обоснование разработки фитосбора «БИФОЛИЯ» / Е.Ф. Семёнова, А.П. Правосудова, С.С. Грабова [и др.] // Медицинские технологии в охране здоровья здоровых, в диагностике, лечении и реабилитации больных: сб. ст. VIII науч.-практ. конф. с междунар. участием. – Пенза: Изд-во ПГУ, 2012. – С. 197-198.
13. Семенова Е.Ф. Разработка фитосбора «Бифолия+» / Е.Ф. Семенова, О.В. Понкратова, В.П. Величко [и др.] // Материалы 78-й итоговой студенческой научно-практической конференции с международным участием, посвящённой 95-летию со дня рождения профессора Ю.М. Лубенского. - Красноярск: Тип.КрасГМУ, Версо, 2014– С. 566 – 568.

ANATOMICAL AND MORPHOLOGICAL CHARACTERISTIC OF ROSE  
PETALS OF REPRESENTATIVES OF THE GENUS *ROSA* L.

*Semenova E.F.<sup>1</sup>, Teplitskaya L.M.<sup>2</sup>, Presnyakova E.V.<sup>1</sup>, Mezhennaya N.A.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Medical Institute, Penza state University, Penza, Russia*

<sup>2</sup>*Tavrida National V.I. Vernadsky University, Simferopol, Russia*

*E-mail: nat\_yarm@mail.ru*

Due to the increasing demand for high-quality rose essential oil there is a need to improve diagnosis of essential oil raw material and intensification of technological processes.

We studied in detail the anatomy of the petals of various types and forms of roses with a view to identifying the particular conditions of secretory structures. Objects anatomical and morphological study of the petals were 10 species and 11 hybrids of rose essential. The study microslides were performed using a light microscope MIKMED-1, the content of essential oil was determined according to the method proposed in GF XI.

Highest mass fraction of essential oil were characterized by the following samples: Michurinka, hybrid 7806, Kazanlykskaya, rose yellow, Raduga, Festivalnaya. The essential oil content in the raw material had a tendency to increase for the kinds and forms of pink and yellow petals, as compared with the red and white. Diploid and tetraploid samples were characterized by higher rates of essential oil, compared with triploids and pentaploids. Studies have established the localization of essential oil, to identify the relationship between the content of essential oil, painting petals and number of chromosomes, but also showed that the nature of the location of secretory structures, their size and the amount depends on the species and forms.

**Keywords:** species and forms of roses, painting of petals, endogenous and exogenous secretory structures, essential oil, chromosome numbers.

#### References

1. Nazarenko L.G., Min'kov B.P. i dr. Kul'tura `efiromaslichnoj rozy / pod red. Mustyac`e G.I., Murina A.V. - Kishinev: Shtiinca, 1983. - 186 s.
2. Nazarenko L.G. Roza `efiromaslichnaya (istoriya, biologicheskie osobennosti i selekciya). Kiev: Naukova dumka, 1978. - 200 s.
3. Semenova E.F., Mezhennaya N.A., Fadeeva T.M. Praktikum po botanike. - Penza: Izd-vo PGU, 2012. - 162 s.
4. Samylina I.A., Anosova O.G. Farmakognoziya. Atlas. - M.: GEOTAR-Media, 2007. - T.1. - 192 s.
5. Lotova L.I. Morfologiya i anatomiya vysshih rastenij. - M.: `Editorial URSS, 2000. - 528 s.
6. Gosudarstvennaya Farmakopeya SSSR XI izdaniya. - M.: Medicina, 1989. - Vyp.1 - 336 s.
7. Shmidt V.M. Matematicheskie metody v botanike.- L.: Izd. Leningr. un-ta, 1984. - 288s.
8. Lakin G.F. Biometriya. - M.: Vysshaya shkola, 1990. - 352 s.
9. Bugorskij P.S., Bugara A.M., Teplickaya L.M. Mikromorfologicheskie parametry cvetov rozy // Maslozhirovaya promyshlennost', 1985. - № 7. - S. 23-25.
10. Semenova E.F., Mezhennaya N.A. Mikromorfologicheskie osobennosti lepestkov rozy// UNIVERSITETSKOE OBRAZOVANIE. - Penza: Izd-vo PGU, 2013.- Vyp. 17. - S.430 – 431.
11. Semenova E.F. Farmakognosticheskie aspekty razrabotki preparatov na osnove zhirnomaslichnogo i `efirnomaslichnogo syr'ya / Materialy I Mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoy konferencii «Sovremennye problemy otechestvennoj mediko-biologicheskoy i farmacevticheskoy promyshlennosti. Razvitie innovacionnogo i kadrovogo potentsiala Penzenskoj oblasti». - Penza: PGU, 2011. - S. 73-77.
12. Semenova E.F., Pravosudova A.P., Grabova S.S., Kosmatova E. A., Artamonova I.A. Obosnovanie razrabotki fitosbora «BIFOLIYA» // Medicinskie tehnologii v ohrane zdorov'ya zdorovyh, v diagnostike, lechenii i reabilitacii bol'nyh: sb. st. VIII nauch.-prakt. konf. s mezhdunar. uchastiem. - Penza: Izd-vo PGU, 2012. - S. 197-198.
13. Semenova E.F., Ponkratova O.V., Velichko V.P., Ivanov N.N., Kitaeva I.V. Razrabotka fitosbora «Bifoliya+» // Materialy 78-j itogovoj studencheskoj nauchno-prakticheskoy konferencii s mezhdunarodnym uchastiem, posvyaschennoj 95-letiyu so dnya rozhdeniya professora Yu.M. Lubenskogo. - Krasnoyarsk: Tip.KrasGMU, Verso, 2014 - S. 566 – 568.

*Поступила в редакцию 27.10.2014 г.*

**УДК 591.133.2:612.014.42:594.38**

## **ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА И ПЕРЕМЕННОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ КРАЙНЕ НИЗКОЙ ЧАСТОТЫ НА РАЗВИТИЕ ЭКРАНОИНДУЦИРОВАННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ НОЦИЦЕПЦИИ МОЛЛЮСКОВ**

*Темурьянц Н.А., Костюк А.С., Туманянц К.Н.*

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

Обнаружено, что мелатонин и слабое переменное магнитное поле частотой 8 Гц вызывают одинаковую модификацию ноцицепции у моллюсков при их электромагнитном экранировании. Эта модификация заключается в нивелировании гипералгетического эффекта экранирования, усилении его антиноцицептивного действия. Это сходство позволяет сделать предположение о том, что причиной изменения ноцицепции при действии переменного магнитного поля является его способность изменять секрецию мелатонина.

**Ключевые слова:** мелатонин, переменное магнитное поле крайне низкой частоты, электромагнитное экранирование, моллюски.

### **ВВЕДЕНИЕ**

В настоящее время внимание исследователей различного профиля приковано к изучению физиологической роли мелатонина (МТ) – нейрогормона эпифиза, играющего ключевую роль в различных процессах. Показано, что МТ присутствует практически у всех организмах, населяющих планету [1], благодаря чему он рассматривается как один из самых эволюционно древних регуляторов. Начиная с работ Р. Semm et al. (1980) [2], обнаруживших магниточувствительность эпифиза, изменения концентрации МТ рассматриваются как основная причина магнитоиндуцированных эффектов. Для доказательства этого положения были применены различные способы исследования функционального состояния эпифиза при воздействии электромагнитных факторов: микроэлектродная техника [2], электронная микроскопия [3], определение его концентрации в пинеалоцитах [4-8], сыворотке крови [6, 9-12], моче [13-16] и т.д. Во всех случаях однозначно было зафиксировано снижение секреции МТ при однократном действии электромагнитных факторов различных параметров. Однако последствия многократных воздействий, так же как и эффекты слабых воздействий, практически не исследованы. Для изучения этих закономерностей ранее нами применено введение экзогенного МТ животным, подвергавшимся длительному воздействию умеренного электромагнитного экранирования (ЭМЭ) [17], что позволило выявить фазность секреции МТ при таких воздействиях. Для уточнения и расширения этих данных мы предприняли сравнительное исследование влияния МТ и

низкоинтенсивного переменного магнитного поля (ПеМП) крайне низкой частоты (КНЧ) на развитие экраноиндуцированных изменений ноцицепции у моллюсков.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на наземных моллюсках *Helix albescens* в соответствии с Европейской Конвенцией (2010) под контролем комиссии по биоэтике Таврического национального университета имени В.И. Вернадского.

В эксперименте использовались половозрелые животные, одинаковые по массе и размерам. Моллюсков содержали в светонепроницаемых стеклянных террариумах при постоянной температуре ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), высокой влажности и избытке пищи.

Для реализации поставленной цели было проведено две серии экспериментов. В каждой серии животных делили на три равноценные группы. Моллюски первой группы составили контроль (К). Животных второй группы (ЭМЭ) каждый день помещали в экранирующую камеру ежедневно с 12<sup>00</sup> до 9<sup>00</sup> ч следующего дня, т.е. они находились в условиях ЭМЭ 21 час в сутки в течение 16 дней. Моллюски третьей группы (ПеМП+ЭМЭ) ежедневно находились в экранирующем объеме и дополнительно подвергались трехчасовому воздействию ПеМП КНЧ.

Во второй серии экспериментов животные первой и второй групп были разделены на три подгруппы: моллюски первой подгруппы оставались интактными (контроль), животным второй подгруппы вводили мелатонин (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA): в переднюю долю нижней поверхности подошвы в дозе 1 мг/кг, моллюскам третьей подгруппы вводился эквивалентный объем физиологического раствора. Каждая подгруппа состояла из 15 особей.

Ежедневно с 9<sup>00</sup> до 12<sup>00</sup> ч животных всех групп извлекали из террариумов для тестирования.

Ослабление фонового ЭМП достигалось применением экранирующей камеры размером 2×3×2 м, изготовленной из двухслойного железа «Динамо». Коэффициент экранирования  $V_{\text{DC}}$ , измеренный с помощью феррозондового магнитометра, составляет для вертикальной составляющей 4,4, для горизонтальной – 20. Измерялась также спектральная плотность магнитного шума в камере как в области ультранизких (от  $2 \times 10^{-4}$  Гц до 0,2 Гц), так и в области радиочастот (от 15 Гц до 100 кГц). В области сверхнизких частот измерения производились с помощью феррозондового магнитометра в паре со спектроанализатором, в области радиочастот – индукционным методом. Внутри камеры для частот выше 170 Гц и в области частот от  $2 \times 10^{-3}$  до 0,2 Гц уровень спектральной плотности магнитного шума ниже 10 нТл/Гц<sup>0.5</sup>. Коэффициент экранирования камеры на частотах 50 и 150 Гц порядка трех. В области частот от 150 Гц до 100 кГц происходит слабое экранирование, тогда как на частотах больше 1 МГц имело место полное экранирование.

Таким образом, в нашем исследовании имело место умеренное ослабление как постоянной, так и переменной компонент магнитного поля Земли, в отличие от значительного (100 и более раз) уменьшения таковых, применяемого в подавляющем большинстве исследований [18, 19].

Освещенность внутри и вне камеры, а также внутри террариумов с животными трех групп измерялась с помощью люксметра ТКЛ-ПКМ (модель 63). Внутри

ящиков освещенность колебалась от 0,1 до 0,2 лк, внутри экранирующей камеры, а также в лаборатории, где содержались моллюски контрольной группы, была такого же уровня, а в лаборатории, в которой проводили тестирование, уборку террариумов и т.д., колебалась от 480 до 500 лк. Таким образом, животные находились в условиях темнота : свет 21 : 3 ч.

ПеМП частотой 8 Гц и индукцией 50 нТл создавалось катушками Гельмгольца (диаметр 1 метр) и генератора ГРМ-3. Выбранная частота 8 Гц является фундаментальной частотой ионосферного волновода [20]. Величину магнитной индукции выбирали с таким учетом, чтоб она была значительно выше интенсивности естественного ПеМП на данной частоте. Это позволило уменьшить эффекты неконтролируемых электромагнитных воздействий, а вследствие широкого «амплитудного окна» на этой частоте [21, 22] распространить сделанные выводы на достаточно широкий диапазон интенсивностей ПеМП. Кроме того, учитывали, что для такой интенсивности поля физиологические эффекты надежно воспроизводятся [23]. В нашем исследовании применяли многократные ежедневные трехчасовые экспозиции ПеМП. Именно такова средняя продолжительность геомагнитных возмущений на данной частоте [24].

О состоянии термоноцицептивной чувствительности животных судили по латентному периоду (ЛП) реакции избегания в тесте «горячая пластинка» [25].

Все исследования были проведены с соблюдением принципов двойного слепого эксперимента.

Действие электромагнитных факторов на параметры термоноцицепции оценивалось по коэффициенту их эффективности (КЭ) [26].

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета специализированных программ «MedStat». Вычисляли среднее значение и ошибку среднего ( $\bar{x} \pm S \bar{x}$ ). Сравнение средних величин различных показателей проводили по t-критерию Стьюдента, целесообразность применения которого была показана проверкой полученных данных на закон нормального распределения. Для оценки достоверности различий исследуемых показателей применялся однофакторный дисперсионный анализ. Оценивалась достоверность различий показателей термоноцицептивной чувствительности между группами ( $p_1$ ), а также между исходными значениями и данными, полученными каждый день эксперимента в пределах групп ( $p_2$ ). Различия между группами считали значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали проведенные исследования, пребывание моллюсков в условиях умеренного ослабления магнитного поля Земли, достигаемого применением экранирующей камеры, в течение первых-вторых суток эксперимента не изменяло ЛП реакции избегания термического стимула животных относительно такового животных контрольной группы, а с третьего дня наблюдения регистрируется прогрессирующее нарастание гипералгезии, о чем свидетельствовало снижение КЭэмэ на седьмые сутки до  $-17,18 \pm 1,7\%$  ( $p_2 < 0,01$ ) (рис. 1).

Во второй фазе изменений термоноцицептивной чувствительности при ЭМЭ (12-13 сутки) отмечалось возрастание ЛП на 12% относительно данных у контроля,

КЭэмэ в эти сроки достигал максимума (9,09% – 10,47% ( $p_2 < 0,001$ )), что свидетельствовало о развитии антиноцицептивного эффекта электромагнитного фактора. В течение третьей стадии (14-15 сутки) антиноцицептивный эффект постепенно снижался, достигая исходного уровня данных.

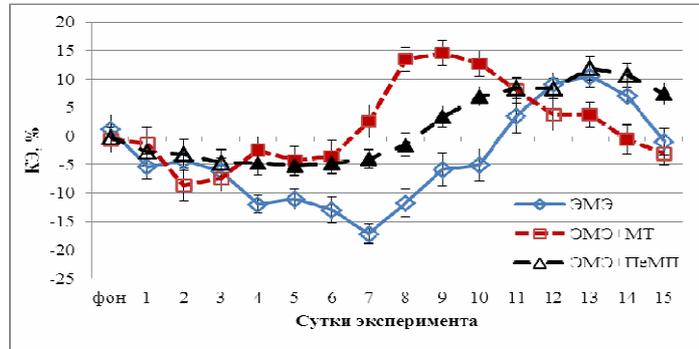


Рис. 1. Динамика ( $\bar{x} \pm S_x$ ) коэффициентов эффективности (%) ЭМЭ, а также ЭМЭ при дополнительном введении мелатонина (ЭМЭ+МТ) и в комбинации с переменным магнитным полем сверхнизкой частоты (ЭМЭ+ПеМП).

*Примечание:* заштрихованные точки – различия достоверны между КЭ у моллюсков в условиях ЭМЭ при введении МТ и действии ПеМП относительно животных, подвергавшихся действию ЭМЭ ( $p < 0,05$ ).

Ежедневная инъекция физиологического раствора интактным моллюскам *Helix albescens* не изменяла параметров ноцицепции, тогда как при введении МТ отмечалось некоторое повышение исследуемых показателей, что совпадает с данными о том, что экзогенный МТ вызывает антиноцицептивный эффект [27].

Ежедневное введение животным, находившимся в условиях экранирования, МТ приводит к нивелированию гипералгетического эффекта, о чем свидетельствуют низкие значения КЭэмэ+мт ( $-8,65 \pm 2,66\%$  ( $p_2 < 0,01$ )) (рис. 1), зарегистрированные у моллюсков в течение первых шести дней, что было на 50% ( $p_1 < 0,001$ ) меньше, чем при ЭМЭ.

Антиноцицептивная фаза в условиях экранирования при введении МТ развивалась раньше на четверо суток, она была на 39% более выражена ( $KЭэмэ+мт = 14,56 \pm 2,20\%$  ( $p_2 < 0,001$ )) и продолжительна, чем при введении физиологического раствора в этих же условиях. В последующие сроки наблюдения отмечалось медленное падение исследуемых показателей до уровня исходных данных.

Анализ результатов исследования показал, что трехчасовое ежедневное воздействие ПеМП КНЧ на моллюсков также аннулирует у них стадию гипералгезии при ЭМЭ, вызывая лишь тенденцию к увеличению термочувствительности. Так, в этих условиях минимальное значение КЭэмэ+пемп зарегистрировано на пятые сутки наблюдения, когда он составил  $-5,18 \pm 1,81\%$ , что было на 69% ( $p_1 < 0,001$ ) меньше, чем при изолированном влиянии ЭМЭ.

При дополнительном воздействии ПеМП частотой 8 Гц на моллюсков, находившихся в условиях ослабления естественного электромагнитного фона, изменения антиноцицептивного эффекта ЭМЭ были на уровне тенденции

(КЭэмэ+пемп =  $11,86 \pm 2,07\%$  ( $p_2 < 0,001$ )). Последующие 14-15 суток эксперимента характеризовались снижением антиноцицептивного эффекта электромагнитных факторов и приближением значений КЭэмэ+пемп к данным фонового дня.

Таким образом, при дополнительном введении моллюскам МТ, а также при воздействии на них ПеМП частотой 8 Гц индукцией 50 нТл в условиях ЭМЭ сохраняется фазность изменений параметров ноцицепции. Оба фактора значительно модифицируют экраноиндуцированные изменения ноцицепции моллюсков, что выражается в нивелировании гипералгетического эффекта и тенденции к возрастанию антиноцицептивного.

Нивелирование экраноиндуцированного гипералгетического эффекта мелатонином соответствует мелатониновой теории действия электромагнитных факторов. При начальном угнетении секреции МТ электромагнитными факторами снижается активность опиоидной системы, т.к. уменьшается продукция  $\beta$ -эндорфина, чувствительность опиоидных рецепторов. Дополнительное введение животным МТ аннулирует или снижает действие электромагнитного фактора, следствием чего является приближение исследуемых параметров ноцицепции к уровню данных контрольных животных.

Из литературных источников известно, что введение МТ при состояниях, сопровождающихся снижением его синтеза, успешно используется для антиноцицепции [28], коррекции десинхронозов [29], а также для угнетения канцерогенеза, неблагоприятных последствий нарушений светового режима [30], метеопатических реакций [31] и т.д.

Во II фазе, по-видимому, продукция мелатонина усиливается. Именно такое явление обнаружено Е.Н. Чуян (2004) после девятикратного воздействия электромагнитным излучением крайне высокой частоты [32]. Это ведет к активации МТ1 и МТ2 рецепторов, а также опиоидной и других антиноцицептивных систем, что и обуславливает развитие антиноцицептивного эффекта.

Принципиальное сходство описанных изменений с результатами воздействия на магнитоиндуцированные изменения ноцицепции ПеМП КНЧ позволяют сделать вывод о том, что ПеМП вызывает изменения секреции МТ, что и является непосредственной причиной обнаруженных изменений.

Таким образом, полученные данные могут рассматриваться не только как доказательство справедливости мелатониновой теории воздействия электромагнитных факторов, но и как свидетельство фазных изменений секреции гормона при этих воздействиях.

Дальнейшие исследования с применением различных доз МТ и ПеМП других параметров должны способствовать развитию этих представлений.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Переменное магнитное поле частотой 8 Гц индукцией 50 нТл и мелатонин вызывают одинаковую модификацию ноцицепции у моллюсков в условиях электромагнитного экранирования. Эта модификация заключается в нивелировании гипералгетического эффекта экранирования, усилении его антиноцицептивного действия.

2. Влияние ПемП частотой 8 Гц на экранообусловленные изменения ноцицепции могут быть опосредованы изменением секреции МТ.

#### Список литературы

1. Fundamental issues related to the origin of melatonin and melatonin isomers during evolution: relation to their biological functions / D.-X. Tan, X. Zheng, J. Kong [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2014. - Vol. 15. – P. 15858-15890.
2. Semm P. Effects of Earth-strength magnetic field on electrical activity of pineal cells / P. Semm, T. Schneider, L. Vollrath // *Nature*. - 1980. – Vol. 288. - P. 607-608.
3. Bardasora J. L. Ultrastructure of pineal cells of the homing pigeon *Columba Bivia* magnetic fields (first trials) / J.L. Bardasora, A.J. Meyer, L. Picazo // *Journal Hirnforsch.* - 1985. – Vol. 26. - P. 471.
4. Cremer-Bartels G. Influence of low magnetic-field-strength variations of the retina and pineal gland of quails and humans / G. Cremer-Bartels, K. Krause, H. J. Kuchle // *Graefe's Arch. Exp. Ophthalmol.* - 1983. - Vol. 220. - P. 248.
5. Magnetic field of the earth as additional zeitgeber for endogenous rhythms? / G. Cremer-Bartels, K. Krause, G. Mitoskas, D. Brodersen // *Naturwissenschaften*. – 1984. – Vol. 71 (11). – P. 567-74.
6. Marked rapid alterations in nocturnal pineal serotonin metabolism in mice and rats exposed to weak intermittent magnetic fields / A. Lerchl, K.O. Nonaka, K.A. Stokkan [et al.] // *Biochem. Biophys. Research Commun.* - 1990. – Vol. 169. – P. 102.
7. Yellon S. M. Acute 60 Hz magnetic field exposure effects on the melatonin rhythm in the pineal gland and circulation of the adult Djungarian hamster / S.M. Yellon // *J. Pineal Res.* – 1994. – Vol. 16(3). – P. 136-144.
8. Chronic exposure to 60-Hz electric fields: effects on pineal function in the rat / B.W. Wilson, L.E. Anderson, D.I. Hilton, R.D. Phillips // *Bioelectromagnetics*. – 1981. – Vol. 2(4). – P. 371–380.
9. Reduction of the nocturnal rise in pineal melatonin levels in rats exposed to 60-Hz electric fields in utero and for 23 days after birth / R.J. Reiter, L.E. Anderson, R.L. Buschbom, B.W. Wilson // *Life Sci.* – 1988. - Vol. 42(22). – P. 2203–2206.
10. Graham C. Human melatonin during continuous magnetic field exposure / C. Graham, M. R. Cook, D.W. Rifle // *Bioelectromagnetics*. - 1996. – Vol.18. – P. 166–171.
11. Effects of exposure to a circularly polarized 50-Hz magnetic field on plasma and pineal melatonin levels in rats / M. Kato, K. Honma, T. Shigemitsu, Y. Shiga // *Bioelectromagnetics* – 1993. – Vol. 14(2). – P. 97-106.
12. Recovery of nocturnal melatonin concentration takes place within one week following cessation of 50 Hz circularly polarized magnetic field exposure for six weeks. / M. Kato, K. Honma, T. Shigemitsu, Y. Shiga // *Bioelectromagnetics*. – 1994. – Vol. 15(5). – P.489-92.
13. Urinary 6-sulphatoxymelatonin excretion is increased in rats after 24 hours of exposure to vertical 50 Hz, 100 microT magnetic field. / J. Bakos, N. Nagy, G. Thuróczy, L.D. Szabó // *Bioelectromagnetics*. – 1997. - Vol. 18(2). – P. 190-192.
14. Pflugler D. H. Effects of exposure to 16,7 Hz magnetic fields on urinary 6-hydroxymelatonin sulphate excretion of Swiss railway workers / D.H. Pflugler, C.E. Minder // *Journal Pineal Research*. - 1996. – P. 91.
15. Cellular telephone use and excretion of a urinary melatonin metabolite / J.B. Burch, J. S. Reif, C.A. Pittrat, T.J. Keefe and M.G. Yost // In: *Annual review of Research in Biological Effects of electric and magnetic fields from the generation, delivery and use of electricity*, San Diego, CA. – 1997. - P-52.
16. Urinary melatonin levels in human breast cancer patients / C. Bartsch, H. Bartsch, A.K. Jain, K.R. Laumas, L. Wetter-berg // *J. Neural Transm.* – 1981. – Vol. 52. – P. 281-294.
17. Темурьянц Н.А. Участие мелатонина в изменении ноцицепции моллюсков и мышей при длительном электромагнитном экранировании / Н.А. Темурьянц, А.С. Костюк, К.Н. Туманянц // *Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова РАН*. – 2013. – Т. 99 (11). – С. 1333–1342.
18. Asashima M. Magnetic shielding induces early developmental abnormalities in the newt, *Cynops pyrrhogaster* / M. Asashima, K. Shimada, C.J. Pfeiffer // *Bioelectromagnetics*. – 1991. - Vol. 12 (4). – P. 215–224.
19. Mo Wei-Chuan A biological perspective of the hypomagnetic field: from definition towards mechanism / W.-C. Mo, Y. Liu, R.-Q. He // *Progr. Biochem. Biophys.* – 2012. - Vol. 39 (9). – P. 835–842.
20. Schumann W. O. Uber die Dämpfung der elektromagnetischen Eigenwingungen des systems Erde-Luft\_Ionosphere / W. O. Schumann // *Z. Naturwsh.* – 1952. – Vol.7. – P. 250.

21. Макеев В.Б. Проблемы космической биологии / В.Б. Макеев, Н.А. Темуриянц. – 1982. – Т. 43. – С. 116.
22. Adey W. R. Frequency and power windowing in tissue interactions with weak electromagnetic fields / Adey W. R. // Proceedings of the IEEE. – 1980. - Vol. 68. - P. 119-125.
23. Темуриянц Н.А. Сверхнизкочастотные электромагнитные сигналы в биологическом мире / Н.А. Темуриянц, Б. М. Владимирский, О. Г. Тишкин. — Киев: Наукова думка, 1992. – 188 с.
24. Polk G. Resonances of ears ionosphere cavity – extremely low frequency reception at Kingston / G. Polk, F. Fitchen, W.O. Schumann // Radio Propagation. - 1962. - Vol. 3, Is. 66. - P. 313.
25. Патент 48094 Україна, МПК51 А 01 К 61/00. Пристрій реєстрації параметрів больової чутливості наземних моллюсків / Темуриянц Н.А., Вишневський В.Г., Костюк О.С., Макеев В.Б.; заявник та патентовласник Таврійський національний університет ім. В.І. Вернадського. – № U 200908538; заявл. 13.08.2009; опубл. 10.03.2010, Бюл. №5.
26. Prato F.S. Extremely low frequency magnetic fields can either increase or decrease analgesia in the land snail depending on field and light conditions / F.S. Prato, M. Kavaliers, A.W. Thomas // Bioelectromagnetics. - 2000. - Vol. 21. - P. 287-301.
27. Involvement of the pineal gland and melatonin in murine analgesia / M.L. Lakin, C.H. Miller, M.L. Stott, W.D. Winters // Life Sci. - 1981. – Vol. 29 (24). – P. 2543—2551.
28. Melatonin in antinociception: its therapeutic applications / V. Srinivasan, E.C. Lauterbach, K. Y. Ho [et. al.] // Curr Neuropharmacol. - 2012. – Vol. 10 (2). – P. 167—178.
29. Samuels C. H. Jet lag and travel fatigue: a comprehensive management plan for sport medicine physicians and high-performance support teams / C.H. Samuels // Clin. J. Sport Med. - 2012. - Vol. 22 (3). – P. 268.
30. Анисимов В.Н. Эпифиз, мелатонин, старение / В.Н. Анисимов // Хронобиология и хрономедицина. Руководство. М.: ООО Медицинское информационное агенство. - 2012. - С. 284-333.
31. Эффективность мелаксена как адаптогена для профилактики и лечения метеочувствительности больных артериальной гипертензией и ишемической болезни сердца / Р.М. Заславская, Э.А. Щербань, М.М. Тейблум, С.И. Логвиненко // Хронобиология и хрономедицина. Руководство. М.: ООО Медицинское информационное агенство. - 2012. – С. 379-387.
32. Чуян Е.Н. Изменение содержания мелатонина в крови крыс под влиянием низкоинтенсивного электромагнитного излучения крайне высокой частоты / Е.Н. Чуян // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология. Химия». - . 2004. – Т.17 (56), №1. – С. 99-107.

**THE EFFECT OF MELATONIN AND VARIABLE MAGNETIC FIELD OF EXTREMELY LOW FREQUENCY TO DEVELOPMENT OF SHIELDING-INDUCED CHANGES OF NOCICEPTION IN SNAILS**

*Temuryants N.A., Kostyuk A.S., Tumanyants K.N.*

*Tavrda National V.I. Vernadsky University, Simferopol, Russia  
E-mail: alexkostyuk@mail.ru*

The present study was an attempt to study the effects of melatonin and variable magnetic field of extremely low frequency to development of shielding-induced changes of nociception in snails.

To achieve this goal was performed two series of experiments. As a result of the research it was found that a daily injection of melatonin at a dose of 1 mg/kg and an additional action of variable magnetic field at 8 Hz in animals kept in conditions of electromagnetic shielding lead to the decrease hyperalgesic effect of shielding by 50% ( $p < 0.001$ ) and 69 % ( $p < 0.001$ ), respectively.

In conditions of shielding under influence of melatonin and variable magnetic field of extremely low frequency antinociceptive phase developed earlier, it was more pronounced and longer, than the introduction of saline under the same conditions

Thus, with the additional administration of melatonin in snails and action of variable magnetic field frequency induction 8 Hz 50 nT in condition in electromagnetic shielding Phase changes of parameters nociception stored. Both factors significantly modify shielding-induced changes of nociception in snails, resulting in hyperalgesic effect decreased and antinociceptive increased. This similarity makes it possible to make the assumption that the reason for the change of nociception by the action of variable magnetic field is its ability to alter the secretion of melatonin.

**Keywords:** melatonin, variable magnetic field of extremely low frequency, electromagnetic shielding, snails.

### References

1. Tan D.X., Zheng X., Kong J., Manchester L.C., Hardeland R., Kim S.J., Xu X., Reiter R.J., Fundamental issues related to the origin of melatonin and melatonin isomers during evolution: relation to their biological functions, *Int J Mol Sci.*, **15**, 15858 (2014).
2. Semm P., Schneider T., Vollrath L., Effects of Earth-strength magnetic field on electrical activity of pineal cells, *Nature*, **288**, 607 (1980).
3. Bardasora J.L., Meyer A.J., Picazo L., Ultrastructure of pineal cells of the homing pigeon Columbia Bivia magnetic fields (first trials), *Journal Hirnforsch.*, **26**, 471 (1985).
4. Cremer-Bartels G., Krause K., Kuchle H.J., Influence of low magnetic-field-strength variations of the retina and pineal gland of quails and humans, *Graefe's Arch. Exp. Ophthalmol.*, **220**, 248 (1983).
5. Cremer-Bartels G., Krause K., Mitoskas G., Brodersen D., Magnetic field of the earth as additional zeitgeber for endogenous rhythms?, *Naturwissenschaften*, **71** (11), 567 (1984).
6. Lerchl A., Nonaka K.O., Stokkan K.A., Reiter R.J., Marked rapid alterations in nocturnal pineal serotonin metabolism in mice and rats exposed to weak intermittent magnetic fields, *Biochem. Biophys. Research Commun.*, **169**, 102 (1990).
7. Yellon S.M., Acute 60 Hz magnetic field exposure effects on the melatonin rhythm in the pineal gland and circulation of the adult Djungarian hamster, *J. Pineal Res.*, **16** (3), 136 (1994).
8. Wilson B.W., Anderson L.E., Hilton D.I., Phillips R.D., Chronic exposure to 60-Hz electric fields: effects on pineal function in the rat, *Bioelectromagnetics*, **2** (4), 371 (1981).
9. Reiter R.J., Anderson L.E., Buschbom R.L., Wilson B.W., Reduction of the nocturnal rise in pineal melatonin levels in rats exposed to 60-Hz electric fields in utero and for 23 days after birth, *Life Sci.*, **42** (22), 2203 (1988).
10. Graham C., Cook M.R., Rifle D.W., Human melatonin during continuous magnetic field exposure, *Bioelectromagnetics*, **18**, 166 (1996).
11. Kato M., Honma K., Shigemitsu T., Shiga Y., Effects of exposure to a circularly polarized 50-Hz magnetic field on plasma and pineal melatonin levels in rats, *Bioelectromagnetics*, **14** (2), 97 (1993).
12. Kato M., Honma K., Shigemitsu T., Shiga Y., Recovery of nocturnal melatonin concentration takes place within one week following cessation of 50 Hz circularly polarized magnetic field exposure for six weeks, *Bioelectromagnetics*, **15** (5), 489 (1994).
13. Bakos J., Nagy N., Thuróczy G., Szabó L.D., Urinary 6-sulphatoxymelatonin excretion is increased in rats after 24 hours of exposure to vertical 50 Hz, 100 microT magnetic field, *Bioelectromagnetics*, **18** (2), 190 (1997).
14. Pfluger D.H., Minder C.E., Effects of exposure to 16,7 Hz magnetic fields on urinary 6-hydroxymelatonin sulphate excretion of Swiss railway workers, *Journal Pineal Research*, 91 (1996).

15. Burch J.B., Reif J.S., Pittratt C.A., Keefe T.J. and Yost M.G., Cellular telephone use and excretion of a urinary melatonin metabolite, *In: Annual review of Research in Biological Effects of electric and magnetic fields from the generation, delivery and use of electricity*, (San Diego, CA., 1997).
16. Bartsch C., Bartsch H., Jain A.K., Laumas K.R., Wetter-berg L., Urinary melatonin levels in human breast cancer patients, *J. Neural Transm.*, **52**, 281 (1981).
17. Temuryants N.A., Kostyuk A.S., Tumanoyants K.N., Involvement of melatonin in changing nociception mollusks and mice with prolonged electromagnetic shielding, *Russian magazine physiological them. Sechenov Academy of Sciences*, **99** (11), 1333 (2013).
18. Asashima M., Shimada K., Pfeiffer C.J., Magnetic shielding induces early developmental abnormalities in the newt, *Cynops pyrrhogaster*, *Bioelectromagnetics*, **12** (4), 215 (1991).
19. Mo Wei-Chuan, Liu Y., He R-Q., A biological perspective of the hypomagnetic field: from definition towards mechanism, *Progr. Biochem. Biophys*, **39** (9), 835 (2012).
20. Schumann W. O. Über die Dämpfung der elektromagnetischen Eigenwingungen des systems Erde-Luft-Ionosphere, *Z. Naturwisch*, **7**, 250 (1952).
21. Makeev V.B., Temuryants N.A., Problems of Space Biology, **43**, 116 (1982)
22. Adey W. R., Frequency and power windowing in tissue interactions with weak electromagnetic fields, *Proceedings of the IEEE*, **68**, 119 (1980).
23. Temuryants N.A., Vladimir B.M., Tishkin O.G., ELF electromagnetic signals in the biological world, 188 (1992).
24. Polk G., Fitchen F., Schumann W.O., Resonances of ears ionosphere cavity – extremely low frequency reception at Kingston, *Radio Propagation*, **3** (66), 313 (1962).
25. No. 48094 Ukraine, MPK51 A 01 K 61/00. Pristriy reestratsii parametriv bolovoï chutlivosti terrestrial molyuskiv / Temur'yants N.A., Vishnevsky V.G., Kostyuk O.S., Makeev V.B.; zayavnik that patentovlasnik Tavriysky natsionalny universitet IM. V.I. Vernadskogo. - № U 200908538; appl. 13.08.2009; publ. 10.03.2010, Bull. №5.
26. Prato F.S., Kavaliers M., Thomas A.W., Extremely low frequency magnetic fields can either increase or decrease analgesia in the land snail depending on field and light conditions, *Bioelectromagnetics*, **21**, 287 (2000).
27. Lakin M.L., Miller C.H., Stott M.L., Winters W.D., Involvement of the pineal gland and melatonin in murine analgesia, *Life Sci*, **29** (24), 2543 (1981).
28. Srinivasan V, Lauterbach E.C., Ho K.Y., Acuña-Castroviejo D., Zakaria R., Brzezinski A., Melatonin in antinociception: its therapeutic applications, *Curr Neuropharmacol*, **10** (2), 167 (2012).
29. Samuels C.H., Jet lag and travel fatigue: a comprehensive management plan for sport medicine physicians and high-performance support teams, *Clin. J. Sport Med*, **22** (3), 268 (2012).
30. Anisimov V.N., pineal melatonin, aging, *Chronobiology and chronomedicine. Guide. M. : Ltd. Medical News Agency*, 284 (2012).
31. Zaslavsky R.M., Scherban E.A., Teyblyum M.M., Logvynenko S.I. Effectiveness melaxen as an adaptogen for the prevention and treatment of patients with arterial meteosensitivity gipertentsyey and coronary heart disease, 379 (2012).
32. Chuyan E.N., Change of melatonin in the blood of rats under the influence of low-intensity electromagnetic radiation of extremely high frequency, *Scientific notes Tauride National University. VI Vernadsky. Series «Biology. Chemistry* ", **17** (56), 99 (2004).

Поступила в редакцию 24.10.2014 г.

**УДК 591.044 : 615.849.11**

## **УЧАСТИЕ ОПИОИДНОЙ СИСТЕМЫ В ИЗМЕНЕНИИ АГРЕССИВНОГО ПОВЕДЕНИЯ КРЫС В УСЛОВИЯХ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ЭКРАНИРОВАНИЯ**

*Темурьянц Н.А., Туманянц К.Н., Костюк А.С., Хусаинов Д.Р., Черетаев И.В.,  
Чайка А.В.*

*Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Россия  
E-mail: timur328@gmail.com*

Длительное электромагнитное экранирование увеличивает межвидовую агрессивность крыс. Более выражено возрастание агрессивности в условиях экранирования у самцов, чем у самок. Введение животным налоксона с 1 по 5 сутки не изменяет уровень агрессивности, а с 7 по 10 сутки наблюдения снижает, что, по-видимому, связано с фазными изменениями активности опиоидной системы: её начальное угнетение сменяется активацией.

**Ключевые слова:** электромагнитное экранирование, межвидовая агрессия, налоксон, опиоидная система.

### **ВВЕДЕНИЕ**

Изучение эффектов электромагнитного экранирования (ЭМЭ) привлекает внимание исследователей различного профиля. Это связано не только с необходимостью решения прикладных задач, заключающихся в выяснении неблагоприятных последствий пребывания и трудовой деятельности в таких условиях, но и с изучением ряда фундаментальных проблем, в частности, доказательства экологической роли геомагнитного поля [1], механизмов действия комбинированных магнитных полей [2, 3], причин и закономерностей модификаций эффектов сверхслабых факторов в условиях экранирования [4, 5].

Адекватной характеристикой целостных реакций организма на любое воздействие, в том числе и ЭМЭ, является изменение поведения, которое играет важную роль в адаптации организма, и рассматривается как интегральный показатель ответа на любое воздействие. Ранее нами было показано, что в условиях ослабленного геомагнитного поля изменяется половое поведение, характеристики вынужденного плавания крыс в тесте Порсолта [6]. Для расширения представлений об изменении поведения в этих условиях необходимы дальнейшие исследования.

Учитывая данные об изменении агрессивного поведения крыс при их пребывании в кольцах Гельмгольца, ослабляющих постоянную компоненту геомагнитного поля [7], мы поставили задачу изучить особенности межвидового агрессивного поведения крыс в условиях длительного экранирования. Основываясь на данных о тесной взаимосвязи между агрессивным поведением и активностью опиоидной системы [8], а также утверждении А.Н. Frey [9] о вовлечении этой

системы в реакцию организма на действие электромагнитных факторов, нами изучено участие опиоидной системы в изменении агрессивного поведения в условиях длительного электромагнитного экранирования.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на 80 белых беспородных крысах – самцах и самках массой  $190 \pm 10$  г. с соблюдением принципов биоэтики в соответствии с международными принципами Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или других научных целей (Directive 2010/63/EU, Страсбург, 2010) [10].

В первой серии экспериментов самцов и самок крыс делили на две группы. Крыс каждой группы (отдельно самок и самцов) помещали в ящики размером  $790 \times 450 \times 390$  мм из светонепроницаемого пластика, крышки и стенки которых имели вентиляционные отверстия. Обеспечивался свободный доступ животных к стандартному для грызунов корму и воде. Контейнеры с животными экспериментальной группы (10 самок и 10 самцов) помещались в экранирующую камеру ежедневно с 1500 до 1000 ч. следующего дня, т.е. они находились в условиях ЭМЭ 19 часов в сутки в течение 10 дней.

Ящики с животными контрольной группы ( $n=10$ ) находились за пределами камеры в той же комнате. Для животных обеих групп соблюдался одинаковый режим температуры ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ), влажности, освещенности, шума. Освещенность внутри и вне камеры, а также внутри ящичков измерялась с помощью люксметра ТКЛ-ПКМ (модель 63). Внутри ящичков освещенность колебалась от 0,1 до 0,2 лк, внутри экранирующей камеры и в лаборатории, в которой содержались крысы контрольной группы, освещенность была такого же уровня, а в лаборатории, в которой проводили тестирование и уборку клеток, колебалась от 480 до 500 лк. Таким образом, животные находились в условиях темнота / свет 19 и 5 ч соответственно.

Роль опиоидной системы в механизмах изменения агрессивного поведения изучали на крысах – самцах. Для этого каждую группу (контрольную ( $n=20$ ) и экспериментальную ( $n=20$ )) делили на 2 подгруппы. Крысам I подгруппы ( $n=10$ ) ежедневно в течение 10 дней внутрибрюшинно вводили 0,2 мл физиологического раствора (Юрия – фарм, Украина), животным 2-ой подгруппы ( $n=10$ ) – блокатор опиоидных рецепторов налоксон (Здоровье народа, Украина) в дозе 5 мкг/кг в 0,2 мл физ. раствора.

Ежедневно с 10 до 15 час животных обеих групп извлекали из ящичков для тестирования и уборки клеток. Оценивалась их межвидовая агрессивность в тесте «реакция на мышь». Для этого в течение 3-х минут определяли контакты каждой крысы с интактной мышью.

Реакцию крысы на мышь оценивали по следующей 5-бальной шкале: 0 баллов – нет реакции; 1 балл – крыса обнюхивает мышь; 2 балла – крыса вылизывает и активно обнюхивает мышь; 3 балла – крыса носит мышь в зубах, покусывает ее или активно преследует; 4 балла – крыса преследует мышь и убивает с латентным

периодом более 10 с; 5 баллов – крыса бросается на мышь и убивает ее с латентным периодом менее 10 с.

Экранирующая камера изготовлена из двухслойного железа «Динамо». Ее устройство и экранирующие свойства описаны ранее [1, 11].

Все исследования были проведены с соблюдением принципов двойного слепого эксперимента.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета специализированных программ «MedStad». Оценку достоверности зарегистрированных изменений проводили с помощью критерия Манна – Уитни.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Результаты проведенного исследования показали, что крысы контрольной группы на протяжении всего 10-дневного эксперимента демонстрировали либо полное отсутствие реакции на мышь (0 баллов), либо обнюхивание животного (1 балл). Пребывание животных в экранирующей камере приводило к возрастанию реакции на мышь как у самок, так и у самцов. Уже на 2 сутки пребывания самок в условиях ЭМЭ агрессивность возрастала более, чем в 2 раза, у самцов эти изменения были более выражены: если на 3-4 сутки агрессивность контрольных животных - самцов оценивалась 0,4-0,6 баллов, то экранирование приводило к ее возрастанию до 1,8 баллов. На 5-6 сутки наблюдения этот показатель несколько снижался (1,25 и 1,0 баллов соответственно), а на 7-10 сутки снова возрастал, достигая максимума на 7 сутки (2,15 балла). На 1 и 10 сутки эксперимента уровень агрессивности достоверно повышался на 382 и 441 % соответственно, в то время как на 5 и 8 сутки наблюдался наименьший рост агрессивности – уровень агрессивности достоверно повышался на 69 и 72% соответственно. В целом была отмечена ритмическая составляющая в динамике агрессивности, более выраженная у животных, находящихся в условиях ЭМЭ (рис. 1).

Таким образом, у крыс, помещенных в экранирующую камеру, в разные дни десятидневного эксперимента межвидовая агрессивность возрастает. Эти данные согласуются с результатами других работ, в которых изучали влияние электромагнитных факторов различных параметров на этот компонент оборонительного поведения животных. Так, было показано изменение агрессивного поведения у крыс с эпилепсией под влиянием переменного магнитного поля интенсивностью 20-500 пТ [12]. В этих исследованиях была обнаружена зависимость выраженности агрессии животных от параметров поля. В работах М.Ю. Ходанович и др. (2013) [7], Т.А. Замощиной и др. (2012) [13] описано возрастание внутривидовой агрессивности крыс в условиях ослабления геомагнитного поля кольцами Гельмгольца. Ими показано, что 25 суточное воздействие гипогеомагнитной среды приводит к увеличению внутривидовой агрессии в ночное время, снижению адаптивных возможностей циркадианной системы крыс к сезонному дрейфу продолжительности светлого промежутка суток и развитию внешнего и внутреннего десинхроноза.

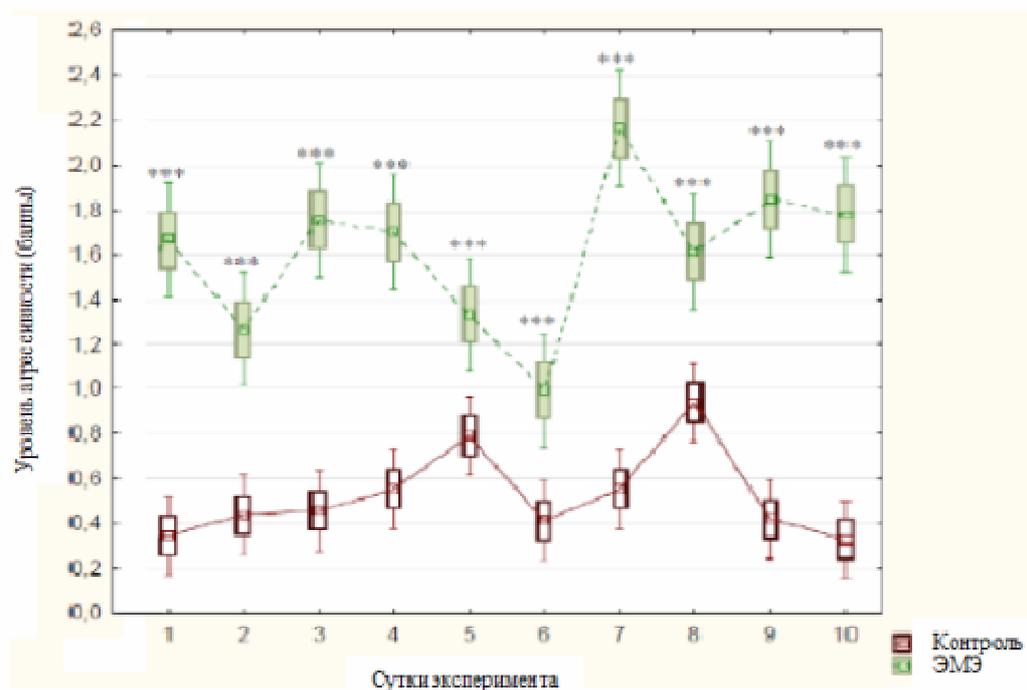


Рис. 1. Динамика агрессивного поведения интактных крыс-самцов, а также животных, подвергшихся электромагнитному экранированию, в тесте «реакция на мышь».

Примечание: звёздочками отмечены достоверные отличия при  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$  относительно контроля.

Д.В. Девицин и др. (2005) [14], проводя эксперименты в многослойной пермаллоевой камере (18 часов ежедневного в течение 21 суток), также обнаружили возрастание межвидовой агрессивности крыс, причем по динамике этого показателя ими описаны индивидуальные различия в реакции животных на гипомагнитную среду.

Как показали исследования, в механизмах изменения агрессивного поведения в условиях ЭМЭ важную роль играет опиоидная система.

Оценка межвидовой агрессии у крыс на фоне ЭМЭ, которым ежедневно вводили налоксон по сравнению с животными, после инъекций физиологического раствора выявлены фазные изменения агрессивности. На 2-6 сутки эксперимента блокада опиоидных рецепторов налоксоном не изменяла межвидовой агрессивности крыс, возросшей в результате ЭМЭ. Однако на 7-10 сутки эксперимента следствием введения налоксона явилось снижение агрессивности в 1,5 – 1,7 раз (рис. 2), однако агрессивность в этой группе животных не достигал уровня контрольных животных.

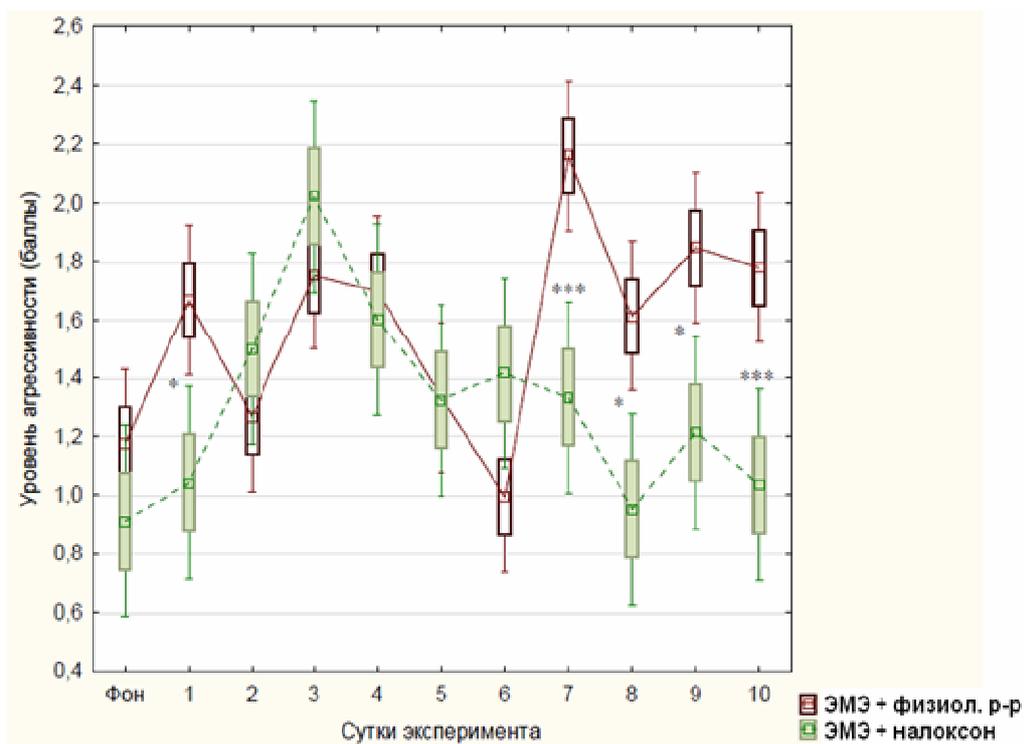


Рис. 2. Динамика агрессивного поведения крыс-самцов, подвергшихся электромагнитному экранированию (ЭМЭ), при введении физ. раствора и налоксона в тесте «реакция на мышь».

Примечание: звёздочками отмечены достоверные отличия при \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  относительно ЭМЭ.

Таким образом, опиоидная система участвует в механизмах физиологического действия ослабленного электромагнитным экранированием геомагнитного поля. Эти данные согласуются с результатами других исследователей.

Так, М.Ю. Ходанович и др.(2013) [7] показали снижение числа опиоидергических клеток под влиянием гипомагнитной среды, наиболее выраженное в структурах таламуса и сером околосредовом веществе, а также уменьшение числа активных, т.е. экспрессирующих вещества, опиоидергических нейронов.

Изменения активности опиоидной системы в условиях ослабленного геомагнитного поля следует расценить как причину модификации болевой чувствительности животных, что может быть причиной повышения агрессивности животных. Действительно, Del Serria et. al, (2000) [15] обнаружили снижение антиноцицептивных ответов мышей, находившихся в камере из  $\mu$  - металла, и роль опиоидов в этом явлении.

Поскольку в нашей работе у интактных крыс-самцов в условиях длительного ЭМЭ также наблюдалось увеличение межвидовой агрессивности относительно контроля на протяжении всего периода эксперимента (рис. 1). На фоне введения налоксона у крыс в условиях ЭМЭ по сравнению с группой, подвергавшейся только ЭМЭ, на 7-10 сутки эксперимента наблюдалось снижение межвидовой агрессивности по сравнению с 1-6 сутками эксперимента.

Следует подчеркнуть, что на разных этапах электромагнитного экранирования, как обнаружено и в настоящем исследовании, изменения активности опиоидной системы не одинаковы. Эти данные согласуются с результатами F.S. Prato et.al (2005) [16].

Ранее нами [17] также было обнаружено, что 3-х фазные изменения ноцицепции моллюсков и мышей при длительном электромагнитном экранировании которые сопровождаются фазными изменениями активности опиоидной системы, определяемыми по влиянию налоксона на параметры реакции избегания термического стимула: I фаза - торможение ее активации, в силу чего прогрессирует гипералгезия, II фаза - возрастание ее активности, результатом чего является полное нивелирование антиноцицептивного эффекта ферромагнитного экранирования налоксоном, III фаза - прогрессирующее уменьшение активности опиоидной системы, когда налоксон только редуцирует антиноцицептивный эффект, что, по-видимому, связано с развитием ее толерантности к действию ферромагнитного экранирования.

В проведенных исследованиях на 1-5 сутки, по-видимому имеет место торможение активности опиоидной системы, а в последующие 7-10 дни ее активация, с чем связано обнаруженное снижение агрессивности животных. Такие фазные изменения активности опиоидной системы могут быть обусловлены соответствующими перестройками секреции мелатонина, которая меняется под влиянием электромагнитных факторов [18]. При начальном их угнетении секреция мелатонина снижается чувствительность опиоидных рецепторов, уменьшается продукция  $\beta$ -эндорфина. Во II фазе по-видимому, продукция мелатонина усиливается, активируются M1 и M2 рецепторы, а также опиоидная система, что и обуславливает развитие антиноцицептивного эффекта, снижение агрессивности.

Дальнейшее исследования позволят выявить участие и других нейрохимических систем в изменении поведения животных в условиях электромагнитного экранирования. Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, в рамках научного проекта р\_юг\_а № 14-44-01617 (проект «Механизмы изменения поведения крыс в условиях умеренного электромагнитного экранирования»).

#### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

1. При десятисуточном электромагнитном экранировании межвидовая агрессивность крыс возрастает уже после 1 суток пребывания животных в экране и не снижается до конца эксперимента. Более выражено повышение агрессивности вследствие экранирования у самцов, чем у самок.

2. Блокада опиоидных рецепторов налоксоном не изменяет уровня агрессивности в течение 1-6 суток эксперимента, а с 6 по 10 сутки межвидовая агрессивность значительно снижается, но не достигает уровня контрольных животных, что связано с возрастанием активности опиоидной системы в этот период.

### Список литературы

1. Эффекты слабых электромагнитных воздействий у беспозвоночных животных (регенерация планарий, ноцицепция моллюсков) / Н.А. Темурьянц, Е.Н. Чуян, А.С. Костюк [и др.] – Симферополь: ДИАЙПИ, 2012. – 303 с.
2. Леднев В.В. Биоэффекты слабых комбинированных постоянных и переменных магнитных полей / В.В. Леднев // Биофизика. – 1996. – Т. 41, Вып. 1. – С. 224–231.
3. Леднев В.В. Биологические эффекты крайне слабых магнитных полей: идентификация первичных мишеней. / В.В. Леднев // Моделирование геофизических процессов. – 2003. – С. 130–136.
4. Коновалов А.И., Рыжкина И.С., Муртазина Л.И. Способ прогнозирования биоэффекта растворов низких и сверхнизких концентраций. Заявка на патент РФ № 2009106496, приоритет от 24.02.09 // БИ. – 20Ю. – № 24.
5. Рыжкина И.С. Самоорганизация высококонцентрированных водных растворов - ключ к пониманию механизма действия сверхмалых доз биологически активных веществ / И. С. Рыжкина // VI Международный конгресс «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине» – 2012. – С. 90.
6. Влияние длительного электромагнитного экранирования на поведенческие реакции крыс / А.С. Костюк, Н.С. Ярмолюк, К.Н. Туманянц [и др.] // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2013. – Т. 26 (65), № 2. – С. 75–81.
7. Влияние долговременного ослабления геомагнитного поля на агрессивность лабораторных крыс и активацию опиоидергических нейронов / М.Ю. Ходанович, Е.В. Гуль, А.Е. Зеленская и др. // Вестник Томского государственного университета. Биология. - 2013. - № 1 (21). - С. 146-160.
8. Aggression and the three opioid families (endorphins, enkephalins, and dynorphins) in mice / S. Tordiman, M. Carlier, D. Cohen [et.al] / Behav Genet – 2003 – Vol. 33, Is. 5. – P. 529–536.
9. Frey A.H. Electromagnetic field interactions with biological systems / A.H. Frey // FASEB J. 7 – 1993. – No. 2. – P. 272–281.
10. Европейская Конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 г.), гл. III, ст. 6.
11. Темурьянц Н.А. Динамика и инфранианная ритмика температурной/болевой чувствительности моллюска *Helix* в условиях воздействия электромагнитных полей / Н.А. Темурьянц, А.С. Костюк, К.Н. Туманянц // Нейрофизиология / Neurophysiology. – 2010. – Т. 42, № 4. – С. 329–339.
12. St-Pierre L.S. Experimental induction of inter male aggressive behavior in limbic epileptic rats by weak, complex magnetic fields: implications for geomagnetic activity and the modern habitat? / L.S. St-Pierre, M.A. Persinger, S.A. Koren // The International Journal of Neuroscience. – 1998. – Vol. 96, № 3-4. – P. 149–159.
13. Влияние моделируемых гипомангнитных условий дальнего космического полета на ритмическую организацию поведенческой активности крыс / Т. А. Замошина, Н. А. Кривова, М. Ю. Ходанович [и др.] // Авиакосмическая и экологическая медицина – 2012. – № 1. – С. 17–23.
14. Девидин Д.В. Динамика физиологических характеристик и эмоционально-поведенческой реактивности животных в преформированной геомагнитной среде / Д.В. Девидин, Н.А. Пальчикова, А.В. Трофимов [и др.] // Бюллетень СО РАМН. – 2005. – № 3. – С. 71–77.
15. Del Seppia C. Exposure to a hypogeomagnetic field or to oscillating magnetic fields similarly reduce stress-induced analgesia in C57 male mice / C. Del Seppia, P. Luschi, S. Ghione [et al.] // Life Sci. – 2000. – Vol. 66, № 14. – P. 1299–1306.
16. Prato F.S. Daily repeated magnetic field shielding induces analgesia in CD-1 mice / F.S. Prato, J.A. Robertson, D. Desjardins [et al.] // Bioelectromagnetics. – 2005. – Vol. 26. – P. 109–117.

17. Temuryants N.A. Role of the opioid system in the modulation of thermnociceptive sensitivity of mollusks affected by weak electromagnetic factors / N.A. Temuryants, A.S. Kostyuk // Neurophysiology. – 2012. – Vol. 43, Is. 5. – P. 355–364.
18. Темуриянц Н.А. Участие мелатонина в изменении ноцицепции моллюсков и мышей при длительном электромагнитном экранировании / Н.А. Темуриянц, А.С. Костюк, К.Н. Туманянц // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2013. – Т. 99, № 11. – С. 1333–1341.

**THE PARTICIPATION OF THE OPIOID SYSTEM IN MODIFYING  
AGGRESSIVE BEHAVIOR OF RATS IN CONDITIONS OF  
ELECTROMAGNETIC SHIELDING**

*Temuryants N.A., Tumanyants K.N., Kostyuk A.S., Khusainov D.R.,  
Cheretaev I.V., Chajka A.V.*

*Tavrida National V.I. Vernadsky University, Simferopol, Russia  
E-mail: timur328@gmail.com*

Long-term electromagnetic shielding increases interspecific aggression in rats. More pronounced increase of aggressiveness in terms of shielding in males than in females.

To study the role of the opioid system in the mechanisms of aggressive behavior of male rats under EMS (electromagnetic shielding) each group (control and experimental) were divided into 2 subgroups. Rats subgroup I (n=10) daily for 10 days were injected intraperitoneally with 0.2 ml of physiological saline, animals second subgroup (n=10) - opioid receptor blocker naloxone, at a dose of 5 mcg / kg dissolved in physiological saline.

Interspecific aggression was assessed in the test "reaction to the mouse." To do this, for 3 minutes each rat was determined by contact with the intact mouse.

Results of the study showed that the rats in the control group throughout the 10 - day of the experiment showed a complete lack of response to the mouse (0 points), or sniffing animal (1 point). Stayed animals shielding chamber leads to an increase in c: it is necessary to distinguish two peaks of aggressiveness in the group EMS on the 1st and 10th days of the experiment - the level of aggressiveness was significantly increased by 382% and 441%, respectively, at the same time for 5 or 8 days was observed the lowest growth aggression - aggression level was significantly increased by 69% and 72%, respectively. Marked rhythmic component in the dynamics of aggression is more pronounced in the animals living under EMS.

The introduction of animals with naloxone 1 to 5 days does not change the level of interspecific aggressiveness, and from 7 to 10 days of observation decreases, which seems to be due to phase changes in the activity of the opioid system: depression followed by activation.

**Keywords:** electromagnetic shielding, interspecific aggression, naloxone, opioid system.

## References

1. Temuryants N.A., Chuyan E.N., Kostyuk A.S., Tumanyants K.N., Demtsun N.A., Yarmolyuk N.S., Effects of weak electromagnetic factors on the invertebrates (regeneration of planaria, nociception of snails), Monograph, (Simferopol, 2012).
2. Lednyov V.V., Bioeffects of weak combined fixed and variable magnetic fields, *Biophysics*, 41(1), 224 (1996).
3. Lednyov V.V., Biological effects of extremely weak magnetic fields: identification of primary targets, *Modeling of geophysical processes*, 130 (2003).
4. Kononov A.I., Ryzhkina I.S., Murtazina L.I., Method of predicting the biological effects of low and very low solution concentrations, The patent application of RF № 2009106496, priority from 24.02.09, № 24.
5. Ryzhkina I.S., Self-organization vysokorazbavlenykh aqueous solutions - a key to understanding the mechanism of action of ultra-low doses of biologically active substances, VI International Congress "Weak and ultra -fields and radiation in biology and medicine", 90, (2012).
6. Kostyuk A.S., Yarmolyuk N.S., Tumanyants K.N., Lebedev A.V., Long-term effects of electromagnetic screening for behavioral response of rats, *Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry*, 26(65), 2, 75, (2013).
7. Khodanovich M.U., Gul E.V., Zelenskaya A.E., Pan E.S., Krivova N.A., Effect of long-term weakening of the geomagnetic field on the aggressiveness of laboratory rats and activation of opioidergic neurons, *Bulletin of the Tomsk State University. Biology*, 1(21), 146, (2013).
8. Tordiman S., Carlier M., Cohen D., Cesselin F., Bourgoin S., Colas-Linhart N., Petiet A., Perez-Diaz F., Hamon M., Roubertoux P.L., Aggression and the three opioid families (endorphins, enkephalins, and dynorphins) in mice, *Behav Genet*, 33(5), 529, (2003).
9. Frey A.H., Electromagnetic field interactions with biological systems, *FASEB J.* 7, 2, 272, (1993).
10. The European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes, Strasbourg, March 18, 3(6), (1986).
11. Temuryants N.A., Kostyuk A.S., Tumanyants K.N., The dynamics and rhythm infradian temperature / pain sensitivity mollusk *Helix* in terms of exposure to electromagnetic fields, *Neurophysiology*, 42(4), 329, (2010).
12. L.S. St-Pierre, M.A. Persinger, S.A. Koren, Experimental induction of inter male aggressive behavior in limbic epileptic rats by weak, complex magnetic fields: implications for geomagnetic activity and the modern habitat?, *The International Journal of Neuroscience*, 96, 3-4, 149, (1998).
13. Zamoschina N.A., Krivova M., Khodanovich Yu., Truhanov K.A., Tukhvatulin R.T., Zaeva O.B., Zelenskaya A.E., Gul E.V., Effect of simulated conditions hypomagnetic deep space missions on the rhythmic organization of behavioral activity of rats, *Aerospace and environmental medicine*, 1, 17, (2012).
14. Devitsin D.V., Palchikova N.A., Trofimov A.V., Selyatitskaya V.G., Treasurers V.P., Dynamics of physiological characteristics and emotional-behavioral reactivity of animals in preformed geomagnetic environment, 3, 71, (2005).
15. Del Seppia C., Luschi P., Ghione S., Crosio E., Choleris E., Papi F., Exposure to a hypogeomagnetic field or to oscillating magnetic fields similarly reduce stress-induced analgesia in C57 male mice, *Life Sci*, 66(14), 1299, (2000).
16. Prato F.S., Robertson J.A., Desjardins D., Hensel J., Thomas A.W., Daily repeated magnetic field shielding induces analgesia in CD-1 mice, *Bioelectromagnetics*, 26, 109, (2005).
17. Temuryants N.A., Kostyuk A.S., Role of the opioid system in the modulation of thermnociceptive sensitivity of mollusks affected by weak electromagnetic factors, *Neurophysiology*, 43(5), 355, (2012).
18. Temuryants N.A., Kostyuk A.S., Tumanyants K.N., Involvement of melatonin in changing nociception mollusks and mice with prolonged electromagnetic shielding, *Ros. Fiziol. Zh. them. I.M. Sechenov*, 99(11), 1333, (2013).

*Поступила в редакцию 29.10.2014 г.*

УДК 577.151.121:616.092.9

## ПОКАЗАТЕЛИ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА КРЫС В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОЙ ПРОЛОНГИРОВАННОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИИ

Цейслер Ю.В.<sup>1</sup>, Нурищенко Н.Е.<sup>1</sup>, Мартынюк В.С.<sup>1</sup>, Подпалова О.Н.<sup>2</sup>, Шелюк О.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> УНЦ «Институт биологии» Киевский национальный университет  
имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

<sup>2</sup> Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, Киев, Украина  
E-mail: yuliya.tseysler@gmail.com

Изучены показатели липидного обмена в крови крыс в условиях хронической 11-месячной алкоголизации. Показано, что начиная с двух месяцев потребления этанола, повышается содержание общих липидов (в плазме крови на 30%, в эритроцитарной массе на 65%). Для более длительных периодах алкоголизации (4-11 месяцев) уровень липидов сохранялся почти таким же, тогда как в эритроцитарной массе не отличается от контрольных значений. Содержание диеновых конъюгатов в плазме снижается, а количество кетонных производных жирнокислотных остатков липидов - увеличивается, что указывает на угнетение отдельных звеньев антиоксидантной системы, связанных с детоксикацией гидроперекисей жирных кислот, и активацию процессов свободнорадикального повреждения тканей. Достоверных изменений в содержании продуктов перекисного окисления в эритроцитарной массе ни на одном этапе алкоголизации выявлено не было.

**Ключевые слова:** этанол, липидный обмен, перекисное окисление липидов.

### ВВЕДЕНИЕ

Алкоголизм является одной из первостепенных медико-социальных проблем современного общества. Одна сторона этой проблемы связана с тем, что алкоголизму присущи свойства наркотической зависимости, другая сторона проблемы заключается в многогранном патологическом воздействии алкогольной интоксикации на органы и системы организма человека, что исключает преодоление последствий длительного потребления алкоголя. Больные алкоголизмом умирают, как правило, не от алкогольной болезни, а от сопутствующих заболеваний и расстройств, которые развиваются в результате снижения иммунных возможностей защиты организма и его резистентности к раздражителям различной природы, и, как следствие, поражения жизненно важных органов и систем. Несмотря на то, что исследованиями влияния алкоголя на организм активно занимаются с 70-х годов прошлого века, многие аспекты этой проблемы остаются невыясненными, особенно паталогические изменения отдельных метаболических процессов, происходящих в условиях хронической пролонгированной алкогольной зависимости. Наглядным показателем патологического состояния организма является изменение уровня липидов в крови и продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), которые часто оценивают по содержанию диеновых конъюгатов и кетонов [1], и, как показано в некоторых работах, при длительном употреблении алкоголя эти показатели могут

отклоняться от нормы [2-4]. В связи с этим целью исследования было изучение показателей липидного обмена крови хронически алкоголизированных крыс для оценки деструктивных нарушений в организме.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на белых беспородных крысах-самцах весом 150-200 г, получавших в течение всего эксперимента стандартный рацион, состоящий из стандартизированных кормов вивария. Алкоголизацию животных осуществляли по методике [5] в авторской модификации. Животных отбирали на основе их индивидуальной склонности к потреблению раствора этилового спирта, которая оценивалась в течение двух недель ежедневным измерением количества потребленного 5% -ного раствора алкоголя.

Экспериментальную группу составили крысы, которые, находясь в условиях свободного выбора, предпочитали раствор алкоголя с первого дня тестирования. Количество потребляемого спиртового раствора колебалось от 15 мл в сутки и выше на животное. После тестирования концентрацию этилового спирта для экспериментальных животных следующие две недели постепенно повышали от 5 до 36% с шагом в 10% и в дальнейшем не меняли. Хроническую алкоголизацию животных осуществляли в течение двух (n = 7), четырех (n = 8), шести (n = 7), восьми (n = 11) и одиннадцати (n = 12) месяцев.

Параллельно с каждой экспериментальной группой исследовали контрольную группу, в состав которой входили животные, которые демонстрировали полный отказ от потребления алкоголя и содержались в аналогичных условиях вивария в течение срока эксперимента. Декапитацию животных осуществляли в соответствии с правилами работы с экспериментальными животными согласно протоколу № 36 заседания комиссии по биоэтике УНЦ «Институт биологии» Киевского национального университета имени Тараса Шевченко от 19 августа 2013 г. в соответствующие сроки эксперимента (через 2, 4, 6, 8 и 11 месяцев).

Определение концентрации липидов в плазме крови и эритроцитарной массе крыс осуществляли фотометрическим методом [6], суть которого заключается в экстракции липидов гексан-изопропанольной смесью с последующим их переводом в гексановую фазу и выпариванием гексана. Остающиеся в бюксе липиды окисляли 2% раствором хромовой смеси при инкубации на кипящей водяной бане. К охлажденным образцам добавляли дистиллированную воду, снова охлаждали и фотометрировали на КФК-2 при длине волны  $\lambda = 590$  нм. Стандартный раствор липидов содержал 25 мг холестерина и 25 мг пальмитиновой кислоты в 50 мл гексана. Расчет концентрации липидов осуществляли по формуле:

$$C_{л} = (1 \text{ мг} \times D_{зр}) / (D_{ст} \times V), \text{ мг/мл},$$

где 1 мг - содержание липидов в 1 мл стандартного раствора;  $D_{зр}$  - оптическая плотность исследуемого образца при  $\lambda = 590$  нм (е.о.п.);  $D_{ст}$  - оптическая плотность стандартного раствора при  $\lambda = 590$  нм (е.о.п.); V - объем гексанового экстракта (мл).

Активность перекисного окисления липидов определяли по содержанию его молекулярных продуктов на основе метода Z. Placer [7] в авторской модификации. Для этого отбирали по 0,4 мл плазмы крови или эритроцитарной массы и добавляли

8 мл гексан-изопропанольной смеси (соотношение 1:1) при встряхивании с последующей инкубацией в течение 30 мин. После этого добавляли по 2 мл 0,1 N HCl при интенсивном встряхивании с последующей инкубацией в течение 2 часов. После разделения реакционной смеси на две фракции с верхней фракции брали по 1 мл гексанового экстракта липидов и регистрировали спектр поглощения на BioSpek-mini (Shimadzu Corporation, Япония) в диапазоне  $\lambda = 200-400$  нм. По значениям оптической плотности при длине волны  $\lambda = 233$  нм определяли уровень диеновых конъюгатов, а при  $\lambda = 272$  нм - уровень кетоновых производных, которые выражали в условных единицах на 1 мг липидов в гексановом экстракте по формуле:

$$\text{ПОЛ} = E / (1 \text{ мл} \times C_{\text{л}}), \text{ у. е. / мг липидов,}$$

где E – экстинция гексанового экстракта при  $\lambda = 233$  нм или  $\lambda = 272$  нм,  $C_{\text{л}}$  - концентрация липидов в гексановом экстракте (мг / мл).

Статистическую обработку экспериментальных результатов проводили по общепринятым алгоритмам вариационной статистики [8], достоверность разницы между статистическими выборками оценивали по t-критерию Стьюдента (разницу считали достоверной при  $p < 0.05$ ).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В условиях длительного употребления этанола происходят изменения общего содержания липидов и продуктов ПОЛ в плазме крови. В частности, у животных наблюдалось достоверное увеличение содержания липидов в плазме крови (рис. 1), которое почти не зависело от длительности приема животными этанола. У подопытных животных оно увеличивалось на 31,2%, 30,8%, 37,4%, 34,0% и 31% по сравнению с контролем после 2, 4, 6, 8 и 11 месяцев алкоголизации соответственно.

Содержание общих липидов в мембранах эритроцитов достоверно повышалось на 64,9% только в течение первых двух месяцев алкоголизации, после чего этот показатель на фоне сезонных и возрастных изменений у животных достоверно не отличался от контрольных значений.

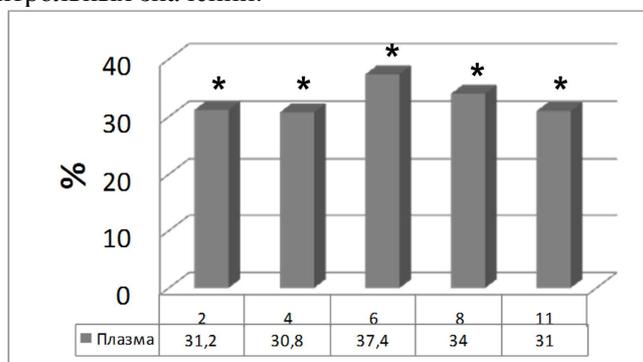


Рис. 1. Изменения содержания общих липидов в плазме крови крыс относительно контрольных значений (%) в условиях хронической алкоголизации в течение 2 (n=7), 4 (n=8), 6 (n=7), 8 (n=11) и 11 (n=12) месяцев.

*Примечание:*\* - достоверные изменения по сравнению с контрольной группой на уровне статистической значимости  $p < 0,05$ .

Результаты анализа продуктов ПОЛ в плазме крови свидетельствуют о разнонаправленном характере изменений диеновых конъюгатов и кетонных производных липидов. Так, содержание диеновых конъюгатов (ДК) почти линейно достоверно снижалось по мере алкоголизации на 7,9%, 18,8%, 22,0%, 20,6% и 19,6% относительно контроля после 2, 4, 6, 8 и 11 месяцев алкоголизации соответственно ( $p < 0,05$ ) (рис. 2). В мембранах эритроцитов достоверных различий в содержании ДК между контрольными и экспериментальными группами выявлено не было. В отличие от ДК определения содержания кетонов в плазме крови показало их увеличение на 12,5%, 28%, 40%, 15% и 9% по сравнению с контролем после 2, 4, 6, 8 и 11 месяцев употребления этанола ( $p < 0,05$ ) (рис. 3).

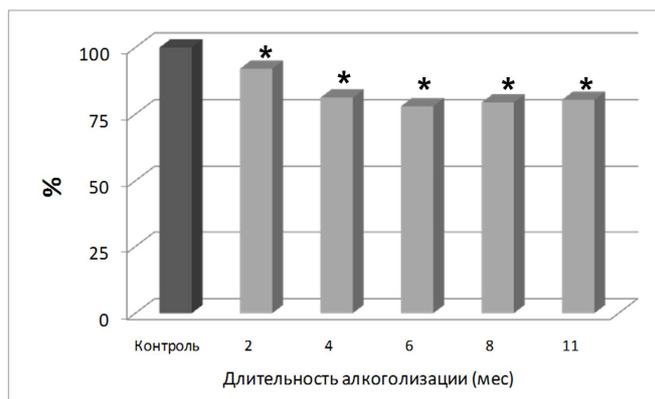


Рис. 2. Содержание диеновых конъюгатов в плазме крови крыс (%) в условиях хронической алкоголизации в течение 2 (n = 7), 4 (n = 8), 6 (n = 7), 8 (n = 11) и 11 (n = 12) месяцев относительно контроля.

Примечание: см. рис.1.

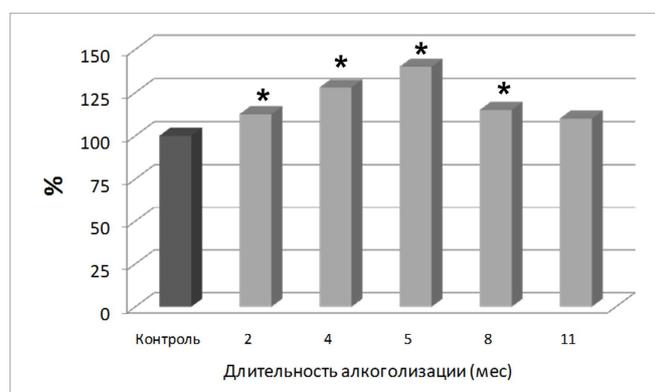


Рис. 3. Содержание кетонов в плазме крови крыс (%) в условиях хронической алкоголизации в течение 2 (n = 7), 4 (n = 8), 6 (n = 7), 8 (n = 11) и 11 (n = 12) месяцев относительно контроля.

Примечание: см. рис.1.

Что касается данного показателю в мембранах эритроцитов, то по сравнению с контролем достоверных изменений в содержании кетоновых производных обнаружено не было.

Стоит обратить внимание на то, что в оптических спектрах гексанового экстракта контрольных образцов плазмы крови, кроме максимума поглощения альдегидных и кетоновых производных  $\lambda_{\text{max}} = 272$  нм, всегда наблюдался небольшой максимум при  $\lambda_{\text{max}} = 375-380$  нм, однако в образцах, полученных от крыс, которые употребляли этанол, поглощение практически исчезало (рис. 4). Учитывая неполярную природу гексана, который использовался в качестве липид-экстрагирующего вещества, наиболее вероятно, что поглощение света в этой области связано с присутствием в плазме крови жирорастворимого витамина А2. Такое предположение основывается на том, что в спиртовых растворах он имеет максимум поглощения при 354 нм [9], но с увеличением неполярности растворителя максимум поглощения витаминов группы А сильно сдвигается в длинноволновую область [10]. Другие липиды и жирорастворимые витамины и гормоны не поглощают в этой области. Известно, что витамины группы А проявляют антиоксидантные свойства [11], поэтому снижение его содержания в крови у крыс, хронически употреблявших алкоголь, может дополнительно свидетельствовать о системном угнетении активности антиоксидантной системы организма. С другой стороны падения уровня витамина А в крови скорее всего связано с повреждением гепатоцитов печени, в которых в условиях нормы происходит образование витамина А путем окислительного расщепления каротинов, поступающих в организм с пищей.

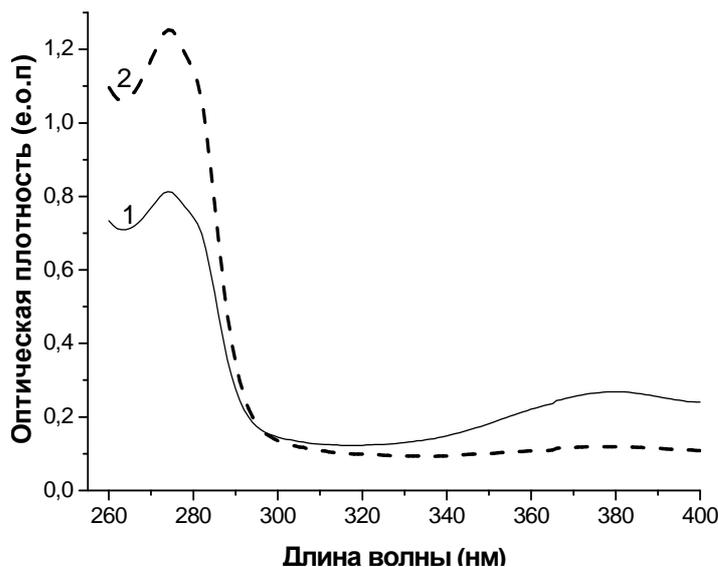


Рис. 4. Типичные спектры поглощения гексанового экстракта плазмы крови крыс в ближнем ультрафиолетовом диапазоне.

*Примечания:* 1 - контроль, 2 - употребление этанола в течение 8 месяцев. Диапазон поглощения кетоновых и альдегидных групп - 273-280 нм, максимум поглощения 377-380 нм, гипотетически соответствует витамина А.

Повышение содержания общих липидов в плазме крови алкоголизованных животных свидетельствует о достоверных изменениях липидного обмена в организме вследствие активации обмена жиров и/или замедления их катаболизма. Практически одинаковое увеличение содержания липидов в плазме крови животных с разной продолжительностью алкоголизации приблизительно на 30% может быть объяснено тем, что организм не может адаптироваться и откорректировать процессы липидного обмена даже при длительном употреблении этанола. С другой стороны, фазное повышение содержания общих липидов в эритроцитарных мембранах животных после их двухмесячной алкоголизации вероятно может свидетельствовать об определенной неспецифической адаптационной реакции системы крови животных к этанолу, дальнейшее развитие которой приводит к частичной нормализации структурно-функционального состояния эритроцитарных мембран.

Противоположная направленность изменений содержания ДК и кетоновых производных липидов в плазме крови в условиях пролонгированной алкоголизации, на наш взгляд, свидетельствует о том, что в тканях, в зависимости от длительности употребления этанола, подавляется активность отдельных глутатион-зависимых звеньев антиоксидантной системы. Такое подавление приводит к активации процессов ПОЛ и ускорению деградации первичных продуктов перекисного окисления - ДК, в свою очередь способствует накоплению более окисленных продуктов - кетонов и альдегидов. Известно [12], что повышенное содержание в плазме кетоновых производных липидов характерно для многих патологических состояний - острое и хроническое воспаление, различные виды интоксикации, сахарный диабет, голодание, тяжелая физическая нагрузка и др. Получается, что выявленный в наших исследованиях факт повышения уровня кетонов на фоне снижения содержания ДК может свидетельствовать о постепенном снижении работы антиоксидантной системы и усилении свободнорадикального окисления липидов в условиях пролонгированной алкоголизации крыс. Общеизвестно [13], что повышение проницаемости мембран нервных волокон и саркоплазматического ретикула миоцитов под влиянием ПОЛ тормозит передачу двигательных нервных импульсов и тем самым снижает сократительные возможности мышц. Одновременно с этим свободно радикальное повреждение митохондриальных мембран снижает эффективность окислительного фосфорилирования, что ведет к уменьшению энергетического энергообеспечения мышечной ткани. Повышение проницаемости оболочки мышечных клеток может привести к потере мышечными клетками многих важных метаболитов и ферментов, в частности креатинкиназы, что показано в более ранних работах [14]. Таким образом, в масштабе всего организма активация ПОЛ сказывается на возможностях аэробного энергообеспечения, на сократительной способности мышц и, следовательно, на работоспособности организма в целом.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Таким образом, результаты наших исследований свидетельствуют о том, что у крыс в условиях пролонгированной 11-месячной алкоголизации происходит активация свободнорадикального окисления липидов и снижение активности отдельных звеньев антиоксидантной системы. Одновременно с этим угнетение

антиоксидантной системы приводит к образованию более окисленных продуктов ПОЛ. Устойчивые системные нарушения обмена липидов, которые проявляются в виде повышенного содержания общих липидов и активации их свободно радикального окисления, развиваются относительно быстро, а затем сохраняются и усиливаются в течение всего периода употребления алкоголя. Такие изменения могут объяснить комплекс сложных и многосторонних системных нарушений на уровне функционирования отдельно взятых систем организма и их регуляции в условиях хронического влияния алкоголя.

*Исследование проведено при поддержке Гранта Президента Украины для одаренной молодежи 2014 г.*

### Список литературы

1. Медицинские лабораторные технологии. Справочник; [Под ред. А.И. Карпищенко]. – Санкт-Петербург: Интермедика, 2002. – 600 с.
2. Говорил А.В. Изменения сывороточных липидов при алкогольном поражении сердца / А.В. Говорил, А.И. Герасимович, А.П. Филев // Алкогольная болезнь. – М.: - 1997. - № 9. – С. 112-115.
3. Crabb D.W. Alcohol and lipid metabolism / D.W. Crabb, S. Liangpunsakul // Journal of Gastroenterology and Hepatology. – 2006. – Vol. 21. – P. S56–S60.
4. Lussier-Cacan S. Impact of alcohol intake on measures of lipid metabolism depends on context defined by gender, body mass index, cigarette smoking, and apolipoprotein E genotype / S. Lussier-Cacan, A. Bolduc, M. Xhignesse, T. Niyonsega, C.F. Sing // ArteriosclerThrombVasc Biol. – 2002. – Vol. 22. - P. 824-831.
5. Бардина Л.Р. Метаболическая адаптация к алкоголю у крыс, различающихся по предпочтению этанола воде / Л.Р. Бардина, В.И. Сатановская // Вопросы медицинской химии. – 1999. – Том 45, № 2. – С. 117–122.
6. Биохимические методы исследования в клинике; [Под ред. Покровского А.А.] – М.: Медицина, 1969. – С. 287-288.
7. Placer Z. Lipoperoxidationssysteme im biologischen / Material 2. Mitt. Bestimmung der Lipoperoxidation im Säugetierorganismus. Food // Nahrung. - 1968. - Vol. 12. - P. 679-684.
8. Гланц С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. - М.: Практика, 1998. - 459 с.
9. Beate R. Vitamin A Bound to Cellular Retinol-binding Protein as Ultraviolet Filter in the Eye Lens of the Gecko *Lygodactylus picturatus* / R. Beate, A. Reinout, W. De Jong Wilfiend // Journal of Biological Chemistry. – 1996. – Vol. 271 – P. 10437-10440.
10. Мокшина Н.Я. Фотометрическое определение витамина А и провитамина А при совместном присутствии / Н.Я. Мокшина, В.Ю. Хохлов, Ю.В. Шляхина, В.Ф. Селеменов // Вестник ВГУ. Серия «Химия. Биология. Фармация». – 2003. – вып. 2. – С. 53-55.
11. Maxwell Simon R.J. Prospects for the use of antioxidant therapies / Simon R.J. Maxwell // Drugs. – 1995. – Vol. 49(3). – P. 345-361.
12. Campbell M.K. Biochemistry / M.K. Campbell, S.O. Farrell. - 5th. - Cengage Learning, 2006. — P. 579.
13. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы в живых системах : сборник / Ю.А. Владимиров, О.А. Азизова, А.И. Деев, А.В. Козлов. - ВИНТИ. Итоги науки и техники. Сер.: Биофизика. - М., 1991. - № 29. - 249 с.
14. Цейслер Ю.В. АТРазна активність актоміозину скелетних м'язів та маркери ушкодження тканин у крові щурів в умовах тривалої хронічної алкоголізації / Ю.В. Цейслер, О.М. Подпалова, Н.є. Нурищенко, В.С. Мартинюк // Український біохімічний журнал. – 2014. - Т. 86, № 5.- С. 56-64.

## THE INDICATORS OF LIPID METABOLISM IN RATS UNDER CHRONIC PROLONGED ALCOHOL ABUSE

*Yu. V. Tseyslyer<sup>1</sup>, N.E. Nurishchenko<sup>1</sup>, V.S. Martyniuk<sup>1</sup>, O.M. Podpalova<sup>2</sup>,*

*O.V. Shelyuk<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> ESC «Institute of Biology» of Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kiev, Ukraine

<sup>2</sup> Bogomolets National medical university, Kiev, Ukraine

E-mail: yuliya.tseysler@gmail.com

**Purpose.** Alcoholism is one of the primary medical and social problems of modern civilization. Patients die due to not alcohol directly but from related diseases and disorders that develop as a result of destruction of immune capacity and resistance of the organism to stimuli of different nature, as well as injury to vital organs and systems. The level of blood lipids and lipid peroxidation products is adequate indicator of the pathological state of the organism. So, assessment of destructive disorders in the organism based on indices of blood lipid metabolism in rats, chronically alcoholized, was the purpose of the study.

**Methods.** Not-breed white male rats weighing 150-200 g were used in this experiment. The animals were selected on the basis of their individual propensity to consume ethanol solution, which was estimated in two weeks daily by measuring the amount of consumed a 5% solution of alcohol. The experimental group consisted of rats that prefer alcohol solution from the first day of testing. After testing the concentration of ethyl alcohol in experimental animals following two weeks gradually increased from 5 to 36% in increments of 10% and did not change in the future. Chronic alcoholism animals was performed for two, four and six, eight and eleven months. In the control group were animals that showed a complete rejection of alcohol consumption. The assesment of the concentration of lipids in the blood plasma and red blood cells of rats was carried out by the photometric method. The level of lipid peroxidation was revealed using spectrophotometric method proposed by Z. Placer in the our modification.

**Results.** The level of total lipid was increased after two months of alcohol consumption (in blood plasma by 30% and in erythrocyte mass by 65%). For longer periods of alcoholization (4-11 months) the lipid levels remained almost the same, whereas in erythrocyte mass does not differ from control values. The level of diene conjugates in the blood plasma was reduced and the amount of ketone derivatives of fatty acid residues was increases that indicates on inhibition of the some components of the antioxidant system that control detoxification of hydroperoxides of fatty acids and also on activation of free radical damage of tissues. There were no significant changes of lipid peroxidation level in erythrocyte mass during any stage of alcoholization.

**Conclusions:** Activation of free radical oxidation of lipids and decreased of activity of individual links of the antioxidant system occurs in rats with long-term 11-month alcohol abuse. Sustained systemic lipid metabolism disturbances, which manifest themselves as increased total lipid content and activation of their free radical damage develop relatively quickly and then this changes are stored throughout the period of drinking.

**Keywords:** ethanol, lipid metabolism, lipid peroxidation.

References

1. Medical laboratory technology. B.R. / Ed. A.I. Karpishchenko., **2**, 600 p. (St. Petersburg: Intermedika, 2002).
2. Govoril A.V., Gerasimov A.I., Filev A.P. Changes in serum lipids in alcoholic heart lesion, *Alcoholic disease*, **9**, 112-115 (1997).
3. Crabb D.W., Liangpunsakul S. Alcohol and lipid metabolism, *J Gastroenterol Hepatol*, **21**, S56-S60 (2006).
4. Lussier-Cacan S., Bolduc A., Xhignesse M., Niyonsega T., Sing C.F. Impact of alcohol intake on measures of lipid metabolism depends on context defined by gender, body mass index, cigarette smoking, and apolipoprotein E genotype, *ArteriosclerThrombVasc Biol*, **22**, 824-831 (2002).
5. Bardina L.R., Satanov'ska V.I. Metabolic adaptation to alcohol in rats that differ in ethanol preference water, *Problems of Medical Chemistry*, **45**, 117-122 (1999).
6. Biochemical research methods in clinic / Ed. Pokrovsky A.A., P. 287-288 (Meditsina, 1969).
7. Placer Z. Lipoperoxidationssysteme im biologischen / Material 2. Mitt. Bestimmung der Lipoperoxidationim Säugetierorganismus. *Food*, **12**, 679-684. (Nahrung, 1968).
8. Glantz S. *Biomedical Statistics*, 459 p (Praktika, 1998).
9. Beate R., Reinout A., De Jong Wilfiend W. Vitamin A Bound to Cellular Retinol-binding Protein as Ultraviolet Filter in the Eye Lens of the Gecko *Lygodactylus picturatus*, *J Biol Chem*, **271**, (18): 10437-40 (1996).
10. Mokshina N.Ya., Khokhlov V.Yu., Shlyakhina Yu.V., Selemenev V.F. Photometric determination of vitamin A and provitamin A co-presence, *Bulletin VGU. Series «Chemistry. Biology. Pharmacy»*, **2**, 53-55 (2003).
11. Maxwell Simon R.J. Prospects for the use of antioxidant therapies, *Drugs*, **49(3)**, 345-361 (1996).
12. Campbell M.K., Farrell S.O. *Biochemistry*. - 5<sup>th</sup>, 579 p (Cengage Learning, 2006).
13. Vladimirov Y.A., Azizov O.A., Deev A.I., Kozlov A.V. *Free radicals in living systems: collection*, 249 p (VINITI. Results of science and technology. Series: Biophysics, 1991).
14. Tseyslyer Yu.V., Podpalova O.M., Nurishchenko N.E., Martyniuk V.S. Actomyosin ATPase activity of skeletal muscles and the markers of tissue damage in the blood of rats under prolonged chronic alcoholization, *Ukr. Biochem. J.*, **86**, N 5, 56-64 (2014).

Поступила в редакцию 21.10.2014 г.

# ХИМИЧЕСКИЕ НАУКИ

---

Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского  
Серия «Биология, химия». Том 27 (66). 2014. № 3. С. 178-183.

**УДК 543.94**

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЕРОКСИДАЗЫ РЕДЬКИ ЧЕРНОЙ В ТЕСТ-СИСТЕМАХ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЕНОЛОВ

*Вяткина О.В.*

*Таврический национальный университет имени В.И. Вернадского, Симферополь, Россия  
E-mail: oksana\_yatkina@list.ru*

Разработана методика количественного определения гидрохинона, основанная на образовании окрашенных продуктов пероксидазного окисления гидрохинона в системе, где в качестве катализатора используется пероксидаза редьки черной иммобилизованная на силикагеле, синтезированном в кислой среде, с регистрацией сигнала фотоколориметрическим методом.

**Ключевые слова:** пероксидаза, иммобилизация, гидрохинон, погрешность.

### ВВЕДЕНИЕ

Различные отрасли промышленности используют фенолы в качестве сырья, что обуславливает присутствие фенольных веществ в природных водоемах, куда они попадают с промышленными стоками. Для фенолов характерна высокая химическая активность в природных средах, что значительно увеличивает количество химических соединений и токсичных продуктов их превращений, поэтому мониторинг содержания фенолов в водных объектах – актуальная задача. Для решения задач экологического мониторинга наиболее приемлемыми являются on-site методы анализа при помощи тест-систем [1]. Известно, что фенолы являются одними из наиболее легкоокисляемых субстратов пероксидаз. Учитывая тот факт, что ферментативный катализ отличается высокой специфичностью, а продукты окисления фенолов, как правило, окрашены, особый практический интерес представляют ферментные тест-системы определения фенолов. В данной работе представлены результаты разработки новой тест-системы на основе пероксидазы редьки черной иммобилизованной на силикагеле для определения фенольных веществ в водных объектах.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлась пероксидаза, выделенная из корнеплодов редьки черной. Экстракцию фермента фосфатным буфером (рН=6,8) из очищенного и измельченного растительного сырья проводили в течении 15 мин. по стандартной

методике, описанной Селибером [2]. В качестве подложки для иммобилизации фермента был использован силикагель, полученный из силикатного клея при взаимодействии с 6М соляной кислотой при  $pH < 2$ . Иммобилизацию фермента на силикагель проводили методом физической сорбции из раствора, содержащего 20 объемных процентов фосфатно-буферного экстракта пероксидазы (массовое соотношение твердой и жидкой фаз  $\approx 1:40$ ) в течение 2 часов. По истечении времени сорбент отфильтровывали и оставляли высушиваться на воздухе при комнатной температуре. В результате нами был получен материал, содержание фермента в 1 г которого соответствует его содержанию в 5 мл нативного ферментного препарата. Данный препарат использовали в качестве компонента аналитических систем для количественного определения фенольного субстрата в водных растворах. Состав исследуемых систем представлен в таблице 1.

Таблица 1

Состав исследуемых систем

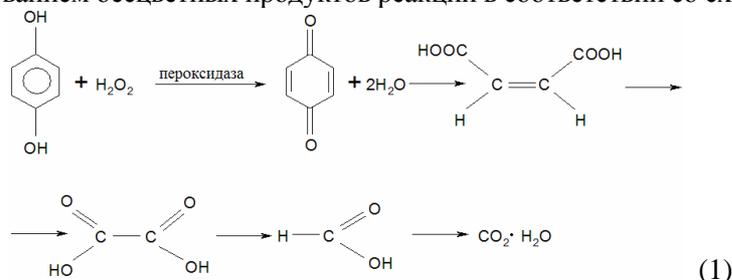
	Система			
	I	II	III	IV
Количество проб в серии, n	10		13	
Концентрация гидрохинона ( $C_{\min} - C_{\max}$ , моль/л)	$8 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-2}$		$1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-2}$	
Объем раствора гидрохинона (V, мл)	20			
Концентрация пероксида водорода (C, моль/л)	0,09			
Объем раствора пероксида водорода (V, мл)	2		3	
Масса ферментного препарата (m, г)	1	0,5	1	0,5
Время экспозиции (t, мин)	40		10	

В каждую пробу к 20 мл водного раствора гидрохинона вносили определенную массу ферментного препарата и приливали пероксид водорода  $H_2O_2$ . Выдерживали фиксированное время. Далее растворы фильтровали и измеряли оптическую плотность на фотоэлектроколориметре КФК-2 при длине волны 440 нм, 490 нм и толщине кюветы  $l=1$  см. Экспериментальные данные обрабатывали методами математической статистики [3]. Полученные результаты сравнивали со стандартным фотоколориметрическим методом количественного определения гидрохинона в системах с  $Fe^{3+}$  и *o*-фенантролином [4].

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наблюдения показали, что достаточно интенсивное красное окрашивание в системах с анолитом I и II, появляется уже в течение первых 20 мин., но после 40 мин. экспозиции интенсивность окраски остается неизменной. Поэтому аналитический сигнал для построения калибровочных кривых в этих системах измеряли через 40 мин.

экспозиции. Общее время проведения анализа составило 50 мин. Системы III и IV отличались от систем I и II большим содержанием субстрата окислителя – пероксида водорода, что привело к сокращению времени появления окраски в них до 10 минут. Но в отличие от систем I и II, достигнув максимального значения, окраска системы не оставалась стабильной, а начинала изменяться в сторону осветления, что, по всей видимости, связано с реализацией дальнейшего окисления окрашенных хиноидных структур с образованием бесцветных продуктов реакции в соответствии со схемой (1).



По этой причине, аналитический сигнал измеряли в данных системах после экспозиции в течение 10 минут, но из-за нестабильности окраски возникли проблемы с воспроизводимостью методики, что отразилось в статистическом анализе её результатов. Общее время выполнения анализа 20 мин. Параллельно было проведено определение концентрации гидрохинона по стандартной методике с раствором железа(III) и *o*-фенантролином [4]. Данный анализ требует большого количества реактивов. Общее время выполнения анализа 90 мин. Калибровочные кривые были аппроксимированы уравнениями типа  $y = bx + a$ . Значения параметров градуировочного графика  $a$  и  $b$  и их доверительные интервалы указаны в табл. 2.

**Таблица 2**  
**Результаты статистической обработки данных в исследуемых системах**

$$y = (b \pm \epsilon_b)x + (a \pm \epsilon_a)$$

Системы	Параметры калибровочной прямой				Стандартный раствор		
	a	$\epsilon_a$	b	$\epsilon_b$	$\bar{Y}_a$	$\bar{X}$	$\epsilon_x$
$\lambda = 440$ нм							
I	0,04	0,02	39	4	0,320	0,007	0,0005
II	0,06	0,03	16	6	0,167	0,007	0,002
III	0,05	0,05	15	1	0,160	0,007	0,004
IV	0,1	0,01	14	2	0,113	0,0007	0,0008
$\lambda = 490$ нм							
I	0,07	0,02	38	3	0,340	0,007	0,0003
II	0,06	0,04	17	6	0,173	0,007	0,002
III	0,05	0,01	13	2	0,157	0,008	0,0008
IV	0,09	0,007	16	1	0,097	0,0003	0,0005
Стандартная методика $\lambda = 580$ нм							
	0,02	0,04	336	38	0,30	0,0008	0,00007

Анализ полученных данных показал, что при избранных длинах волн вид калибровочных зависимостей и их численные параметры практически идентичны для всех исследованных систем (табл. 2). Установили, что чувствительность предложенной нами методики количественного определения гидрохинона максимальна в системе I ( $m$  ферментного препарата=1г,  $V(H_2O_2)=2$  мл), но это в среднем в 9 раз ниже, чем у стандартной методики. На примере систем I и II видно, что увеличение количества ферментного препарата в системе ведёт к повышению чувствительности методики. Однако эта зависимость не выполняется в системах III и IV, где при увеличении концентрации пероксида водорода меняется механизм индикаторной реакции.

Расчетные значения пределов обнаружения ( $C_{min}$ ) представлены в табл. 3. откуда видно, что в системах I и II предел обнаружения практически не зависит от количества внесённого ферментного препарата, минимальным он является в системе I, при  $\lambda=490$  нм, при этом он превышает значение предела в стандартной системе в 5 раз.

Таблица 3

Значения пределов обнаружения  $C_{min}$  гидрохинона в исследуемых системах

Система								
I		II		III		IV		стандарт
$\lambda=440$ нм	$\lambda=490$ нм	$\lambda=440$ нм	$\lambda=490$ нм	$\lambda=440$ нм	$\lambda=490$ нм	$\lambda=440$ нм	$\lambda=490$ нм	$\lambda=580$ нм
$C_{min} \cdot 10^{-4}$ , моль/л								
$6 \pm 0,2$	$5 \pm 0,2$	$6 \pm 0,2$	$6 \pm 0,3$	—	—	$10 \pm 1,2$	$9 \pm 1,0$	$1 \pm 0,3$

В системах III и IV в области низких концентраций наблюдаются значительные отклонения калибровочных зависимостей от линейности и крайне низкая воспроизводимость. Относительная ошибка параметра  $b$  в системе III при  $\lambda=440$  нм  $\Delta b_{440}=100\%$ , при  $\lambda=490$  нм  $\Delta b_{490}=20\%$ ; в системе IV при  $\lambda=440$  нм  $\Delta b_{440}=10\%$ , при  $\lambda=490$  нм  $\Delta b_{490}=8\%$ . Относительная ошибка параметра  $a$  в системе III при  $\lambda=440$  нм  $\Delta a_{440}=7\%$ , при  $\lambda=490$  нм  $\Delta a_{490}=15\%$ ; в системе IV при  $\lambda=440$  нм  $\Delta a_{440}=14\%$ , при  $\lambda=490$  нм  $\Delta a_{490}=6\%$ . Поэтому предел обнаружения в системе III выше на порядок по сравнению с другими системами. А в системе IV данный параметр вовсе определить достоверно невозможно.

Полученные градуировочные прямые использовали для определения количества гидрохинона в стандартных растворах. Каждая серия состояла из трёх определений. Статистическая обработка полученных результатов показана в табл. 2, откуда видно, что минимальной относительной погрешностью, причем допустимой в фотоколориметрии, характеризуется результат, полученный в системе I при длине волны  $\lambda=490$  нм ( $\Delta x_{490}=4,3\%$ ), что ниже погрешности определения в стандартной методике ( $\Delta x_{станд}=8,8\%$ ). Таким образом, система I может быть нами рекомендована как тест-система для полуколичественного колориметрического и количественного фотоколориметрического определения гидрохинона в водных растворах в диапазоне концентраций  $6 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-2}$  моль/л, что ниже уровня ПДК в природной воде. Тем

более, что время выполнения анализа в этом случае почти в 2 раза меньше, чем в стандартной методике и нет необходимости использования большого количества растворов реагентов, что облегчает задачу анализа on-site.

#### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

1. Разработана методика количественного определения гидрохинона, основанная на образовании окрашенных продуктов пероксидазного окисления гидрохинона в системе, где в качестве катализатора используется пероксидаза редьки черной иммобилизованная на силикагеле, синтезированном в кислой среде, с регистрацией сигнала фотоколориметрическим методом.
2. Установлено, что при длинах волн  $\lambda=440$  нм и  $\lambda=490$  нм вид калибровочных зависимостей и их численные параметры практически идентичны.
3. Определено, что чувствительность предложенной нами методики количественного определения гидрохинона при использовании 1 г порошка ферментного препарата 2 мл 3% раствора пероксида водорода в среднем в 9 раз ниже, а предел обнаружения в среднем в 5 раз выше, чем в стандартной методике. Предложенный способ определения гидрохинона в 1,5 раза более экспрессен, чем стандартный и имеет в 2 раза меньшую относительную погрешность определения.

#### **Список литературы**

1. Золотов Ю.А. Химические тест-методы анализа / Ю.А. Золотов, В.М. Иванов, В.Г. Амелин. – М.: Едиториал УРСС, 2002. – 302с.
2. Селибер Г.Л. Большой практикум по микробиологии / Г.Л. Селибер. – М.: Мир, 1962. – 492 с.
3. Чарыков А.К. Математическая обработка результатов химического анализа. Методы обнаружения и оценки ошибок / А.К. Чарыков. – Л.: Химия, 1984. – 168 с.
4. Лурье Ю.Ю. Химический анализ производственных сточных вод / Ю.Ю. Лурье, А.И. Рыбников. – М.: Химия, 1974. – 395 с

#### **USING BLACK RADISH PEROXIDASE IN TEST-METHODS OF PHENOLS` DETERMINATION**

*Vyatkina O.*

*Taurida V.I. Vernadskiy National University, Simferopol, Russia  
E-mail: oksana\_vyatkina@list.ru*

Phenols are raw material for different branches of industry. It has been found to present in natural water bodies, where it comes upon with domestic and industrial wastewater. Phenols characterized by high chemical activity in the natural environment, which significantly increases the amount of toxic chemical compounds and their reaction products therefore monitoring of phenols in water bodies is a problem of current importance. On-site analysis methods by means of test systems are the most appropriate for solving the problems of environmental monitoring. Phenols are known to be among

the most easily oxidized substrates of peroxidase. Enzymatic test systems to determine phenols are considered of particular interest, while enzymatic catalysis characterized by high specificity and the oxidation products of phenols are usually colored.

We have developed a method of quantitative determination of hydroquinone. It is based on the formation of colored products obtained by peroxidase oxidation of hydroquinone in the system, where black radish peroxidase immobilized on silica gel was used as the catalyst and indicator dust. The black radish peroxidase immobilized on silica gel was synthesized in an acid medium, with a photo colorimetric method recording of the signal. Substrate oxidizer is hydrogen peroxide. To each 20 ml sample of an aqueous solution of hydroquinone were added a certain weight of the enzyme preparation and hydrogen peroxide  $H_2O_2$ . After a certain time the solution was filtered. By means of photo electro colorimeter CPC-2 the optical density of solutions was measured at a wavelength of 440 nm, 490 nm, and a 1 cm thick cuvette was used. The experimental data were processed by methods of mathematical statistics. The obtained results were compared to a standard photo colorimetric method of quantitative determination hydroquinone in the systems with  $Fe^{3+}$  and *o*-phenanthroline.

It has been found, at wavelengths  $\lambda=440$  nm and  $\lambda=490$  nm the form of calibration functions and their numerical parameters are almost identical. The suggested method of quantitative determination of hydroquinone is based on using 1 g of an enzyme preparation powder and 2 ml of 3% hydrogen peroxide. It's sensitivity is 9 times lower on average, but the detection limit is 5 times higher than in the standard technique. The proposed method for determining hydroquinone 1.5 times more expressive than standard one, and it has 2 times lower relative observational error.

**Keywords:** peroxidase, immobilization, hydroquinone, observational error

#### References

1. Zolotov Y.A. Chemical Test Methods of Analysis, 302 p. (Editorial URSS, Moscow, 2002) (in Russ.).
2. Seliber G.L., A large workshop in microbiology, 492 p. (Mir, Moscow, 1962). (in Russ)
3. Tcharykov A.K. Mathematical processing of the results of chemical analysis. Methods for detection and assessment of errors, 168 p. (Chemistry, Leningrad, 1984). (in Russ.).
4. Lurie Y.Y, Rybnikov A.I., Chemical analysis of industrial waste water, 395 p. (Khimiya, Moscow, 1974). (in Russ.).

*Поступила в редакцию 15.10.2014 г*

УДК 543.94+579.843.1+579.843.4

## ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ СВЕЯЩИХСЯ БАКТЕРИЙ ЧЕРНОГО И АЗОВСКОГО МОРЕЙ И ИХ АНТИОКСИДАНТНАЯ ЗАЩИТА

*Кацев А.М.*

*Крымский государственный медицинский университет имени С. И. Георгиевского,  
Симферополь, Россия,  
E-mail: katsev@mail.ru*

Изучены ферментативные свойства светящихся бактерий с разным типом люциферазной кинетики. Для бактерий с быстрым кинетическим типом установлены корреляционные зависимости между каталазной активностью клетки и ее удельной люциферазной активностью, а также с чувствительностью бактериальной биолюминесценции к перекиси водорода. Для бактерий с медленным кинетическим типом люциферазы таких корреляций не прослеживалось. Сделаны предположения об участии люциферазы в антиоксидантной защите клетки и о роли генетических механизмов *quorum sensing* и SOS в регуляции синтеза и активности ферментов в условиях окислительного стресса и сред с различной соленостью.

**Ключевые слова:** люминесцентные бактерии, активные формы кислорода, люцифераза, каталаза.

### ВВЕДЕНИЕ

Биолюминесценция – свечение, возникающее в результате биохимических реакций в живых организмах, достаточно широко представлено на разных уровнях организации живой материи [1]. Оно возникает в результате окисления субстрата люциферина и катализируется ферментом люциферазой. Для светящихся бактерий наиболее распространенных морских биолюминесцентных организмов излучение является результатом окисления восстановленного флавиномононуклеотида при участии длинноцепочечного альдегида по реакции:



Несмотря на значительный прогресс в изучении физиологии, биохимии и генетики светящихся бактерий, биологическая роль бактериальной люминесценции остается неясной [2]. Как показано в исследованиях [2–4], биолюминесценция может играть определенную роль в защите клеток живых организмов от окислительного стресса, а люцифераза как фермент, катализирующий свечение, может выполнять антиоксидантную функцию вместе с другими антиоксидантными ферментами (каталаза, супероксиддисмутаза, пероксидаза).

Целью работы было изучение ферментативной активности и антиоксидантных систем светящихся бактерий, выделенных из вод Черного и Азовского морей.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы 20 штаммов светящихся бактерий, выделенных из вод Черного и Азовского морей на территории Крыма. Идентификация выделенных бактерий, а также их фенотипические свойства описаны в работах [5, 6].

Для определения клеточной активности фотобактерии культивировали в колбах в режиме постоянного перемешивания при комнатной температуре (18–20 °С) или повышенной температуре (в термостате), в зависимости от вида бактерий. Через сутки процесс останавливали и в полученных бактериальных суспензиях измеряли интенсивность биолюминесценции, каталазную активность и концентрацию клеток.

Количественное определение каталазной активности проводили с помощью спектрофотометра СФ-46 (ЛОМО, Россия) по уменьшению поглощения при 240 нм, вызванное снижением концентрации перекиси водорода. Для этого 20 мкл суспензии светящихся бактерий, выращенных в течение ночи, смешивали с 2,5 мл 3%-го раствора хлорида натрия, содержащего 50 мкл 3%-й перекиси водорода. Измеряли значения поглощения в течение 60 минут и рассчитывали каталазную активность в единицах активности на бактериальную клетку. Одна единица каталазной активности соответствовала разложению 1 мкмоль перекиси водорода в минуту. Количество бактериальных клеток определяли по поглощению при 600 или 620 нм.

Для определения ферментативной активности *in vitro* бактериальную массу, полученную после культивирования, осаждали центрифугированием при 5000 об./мин. в течение 30 мин. на центрифуге ОПН-8 (для небольших объемов) или MLM K24D (Германия). Бактерии трижды отмывали 3% раствором хлорида натрия, ресуспендировали в небольшом количестве фосфатного буфера с pH=7,0 (0,01 моль/л) и разрушали клетки трехкратной ультразвуковой обработкой по 30 с, используя дезинтегратор UD-11 ("Techpan", Польша). Субклеточные структуры осаждали центрифугированием при 5000 об./мин. в течение 30 мин. Из супернатанта осаждением сульфатом аммония (30–75% от насыщения) выделяли ферментный препарат, который использовали для определения каталазной и люциферазной активностей, а также для изучения кинетики люциферазной реакции.

Определение кинетики люциферазной реакции проводили с использованием додеканаля (Fluka, Switzerland) с использованием измерительного комплекса, представленного на рис. 1.

Изменения биолюминесценции во времени регистрировали с помощью люминометра БЛМ-8801 с самописцем в системе: 20 мкл препарата люциферазы (разведения подбирались экспериментально), 20 мкл 0,001–0,01% эмульсии альдегида, после инициирования реакции 0,5 мл  $10^{-5}$  моль/л фотовосстановленного флавиномононуклеотида (ФМНН<sub>2</sub>), содержащего  $10^{-3}$  моль/л трилона Б. Восстановление ФМН проводили в стеклянном змеевике, который освещался лампой дневного света мощностью 25 Ватт (рис. 1). Критерием восстановления было исчезновение желтой окраски ФМН. Дозирование восстановленного ФМНН<sub>2</sub> осуществляли с помощью дозатора А-2 (Украина) через иглу непосредственно в кювету люминометра.

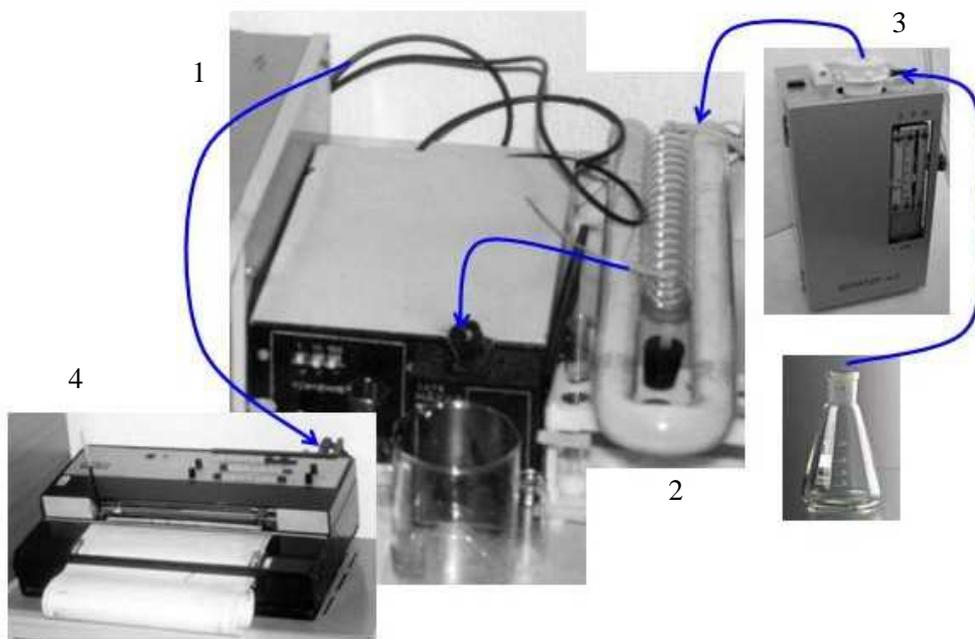


Рис. 1. Схема измерительного комплекса для изучения люциферазной кинетики: 1 – биоломинометр БЛМ-8801; 2 – змеевик с лампой для восстановления ФМН; 3 – дозатор А-2; 4 – самописец (LKB, Швеция).

После инициирования ферментативной реакции самописец регистрировал дальнейшее изменение биоломинесценции во времени. По полученным графическим зависимостям интенсивности биоломинесценции от времени определяли время полузатухания ( $t_{1/2}$ ), что представлено на рис. 2. Значение  $t_0$  соответствует началу реакции при добавлении к реакционной смеси фотовосстановленного ФМН<sub>2</sub>.

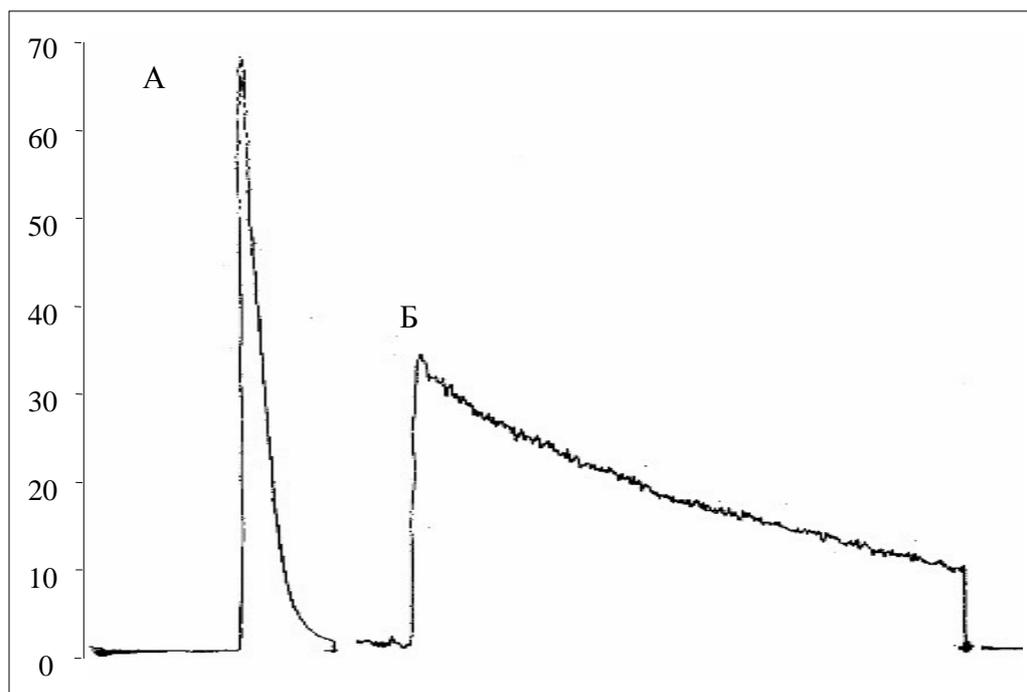


Рис. 2. Определение кинетики люциферазной реакции: А – быстрый тип люциферазной кинетики, Б – медленный тип люциферазной кинетики.

Для оценки люциферазной активности ферментных препаратов в кюветах люминометра смешивали 10 мкл бактериального экстракта, 0,5 мл фосфатного буфера с рН=7,0 (0,1 моль/л), содержащего 0,0002% тетрадеканала. Реакцию инициировали добавлением 0,5 мл фотовосстановленного ФМН<sub>2</sub>, как описано выше. Измеряли максимальное значение интенсивности возникающей биолуминесценции в мВ на мг белка. Концентрацию белка в бактериальных экстрактах определяли по Бредфорду.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее было показано, что устойчивость светящихся бактерий к окислительному стрессу зависит от кинетических свойств люциферазы. Установлено, что штаммы с быстрым типом люциферазной кинетики обладают меньшей устойчивостью к перекиси водорода, чем бактерии с медленным кинетическим типом. При этом активности люциферазы и антиоксидантного фермента каталазы не коррелировали друг с другом, что может означать независимость их функционирования. В тоже время бактерии с быстрым типом кинетики оказались более устойчивы к действию больших концентраций перекиси водорода, чем к действию малых. Было показано, что их свечение усиливалось при увеличении концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> с 0,0005% до 0,005%, что позволило высказать предположение об участии в этом процессе

генетической SOS регуляции. Её активация вызывала увеличение активности или синтеза люциферазы в ответ на стрессовый фактор – высокие концентрации перекиси водорода [7].

Дальнейшее исследование этого вопроса показало, что штаммы с быстрым типом кинетики обладают и другими отличиями. По сравнению с бактериями, имеющими медленный кинетический тип, они характеризовались более высокой интенсивностью удельной клеточной биолюминесценции и активностью люциферазы, а также обладали меньшей способностью накапливать биомассу (таблицы 1 и 2). Отмечены и отличия в качественном тесте на каталазную активность, которая оценивалась по способности бактериальных клеток расщеплять перекись водорода. Все штаммы с медленным типом кинетики были каталазо-положительными, а бактерии с быстрым типом кинетики характеризовались отсутствием или низкой способностью разлагать перекись водорода [7]. При этом анализ каталазной активности *in vitro* не выявил существенных отличий между двумя группами бактерий, как показано в таблицах 1 и 2.

Таблица 1

Свойства штаммов светящихся бактерий с быстрым типом люциферазной кинетики

Штамм	Рост, кл/мл	Люцифераза				Каталаза	
		$t_{1/2}$ , с	мВ/кл	мВ/мл	мВ/мг	Ед/кл	Ед/мг
<i>P. leiognathi</i> W1	$4,8 \cdot 10^7$	1,5	$2,8 \cdot 10^{-3}$	$1,3 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^5$	$2,6 \cdot 10^{-8}$	$2,4 \cdot 10^2$
<i>P. leiognathi</i> W2	$4,2 \cdot 10^7$	1,5	$3,2 \cdot 10^{-3}$	$1,4 \cdot 10^5$	$2,0 \cdot 10^5$	$2,1 \cdot 10^{-8}$	$3,3 \cdot 10^2$
<i>P. leiognathi</i> Sh1	$3,9 \cdot 10^7$	1,5	$2,9 \cdot 10^{-3}$	$1,4 \cdot 10^5$	$3,7 \cdot 10^5$	$2,3 \cdot 10^{-8}$	$3,0 \cdot 10^2$
<i>P. leiognathi</i> Cr1	$5,4 \cdot 10^7$	1,5	$2,6 \cdot 10^{-3}$	$1,4 \cdot 10^5$	$1,4 \cdot 10^5$	$2,8 \cdot 10^{-8}$	$2,0 \cdot 10^2$
<i>P. leiognathi</i> F1	$4,5 \cdot 10^7$	2,2	$2,8 \cdot 10^{-3}$	$1,3 \cdot 10^5$	$2,3 \cdot 10^6$	$3,8 \cdot 10^{-8}$	$9,4 \cdot 10^2$
<i>P. phosphoreum</i> Sq1	$2,6 \cdot 10^7$	2,3	$3,6 \cdot 10^{-3}$	$9,3 \cdot 10^4$	$4,3 \cdot 10^5$	$3,5 \cdot 10^{-8}$	$4,8 \cdot 10^2$
<i>P. phosphoreum</i> Sq3	$3,2 \cdot 10^7$	2,4	$2,9 \cdot 10^{-3}$	$9,5 \cdot 10^4$	$3,7 \cdot 10^5$	$1,0 \cdot 10^{-8}$	$3,3 \cdot 10^3$
<i>P. phosphoreum</i> F2	$2,1 \cdot 10^7$	2,4	$5,3 \cdot 10^{-3}$	$1,1 \cdot 10^5$	$1,4 \cdot 10^6$	$5,4 \cdot 10^{-8}$	$1,3 \cdot 10^3$
<i>V. fischeri</i> F7	$1,1 \cdot 10^8$	1,9	$8,9 \cdot 10^{-4}$	$9,4 \cdot 10^4$	$1,9 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^{-7}$	$1,1 \cdot 10^3$
<i>V. fischeri</i> Sh2	$9,0 \cdot 10^7$	1,5	$9,9 \cdot 10^{-4}$	$8,9 \cdot 10^4$	$6,8 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^{-7}$	$9,4 \cdot 10^2$
<i>V. fischeri</i> F1	$1,8 \cdot 10^8$	1,7	$7,1 \cdot 10^{-4}$	$1,3 \cdot 10^5$	$1,7 \cdot 10^6$	$1,4 \cdot 10^{-7}$	$8,7 \cdot 10^3$
<i>V. logei</i> Sq1	$3,0 \cdot 10^7$	2,3	$4,5 \cdot 10^{-3}$	$1,4 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^5$	$6,7 \cdot 10^{-8}$	$2,3 \cdot 10^3$
<b>М (среднее)</b>	<b><math>6,0 \cdot 10^7</math></b>	<b>1,9</b>	<b><math>2,8 \cdot 10^{-3}</math></b>	<b><math>1,2 \cdot 10^5</math></b>	<b><math>1,3 \cdot 10^6</math></b>	<b><math>6,3 \cdot 10^{-8}</math></b>	<b><math>1,7 \cdot 10^3</math></b>
<b>±m</b>	<b><math>4,6 \cdot 10^7</math></b>	<b>0,4</b>	<b><math>1,4 \cdot 10^{-3}</math></b>	<b><math>1,9 \cdot 10^4</math></b>	<b><math>1,9 \cdot 10^5</math></b>	<b><math>5,6 \cdot 10^{-8}</math></b>	<b><math>2,4 \cdot 10^3</math></b>

Таблица 2

Свойства штаммов светящихся бактерий с медленной люциферазной кинетикой

Штамм	Рост, кл/мл	Люцифераза			Каталаза		
		$t_{1/2}$ , с	мВ/кл	мВ/мл	мВ/мг	Ед/кл	Ед/мг
<i>V. harveyi</i> Ms1	$2,5 \cdot 10^8$	22,0	$3,7 \cdot 10^{-4}$	$9,3 \cdot 10^4$	$6,0 \cdot 10^3$	$6,9 \cdot 10^{-8}$	$6,4 \cdot 10^2$
<i>V. harveyi</i> Ms2	$2,4 \cdot 10^8$	17,5	$3,4 \cdot 10^{-4}$	$8,1 \cdot 10^4$	$4,4 \cdot 10^4$	$4,9 \cdot 10^{-8}$	$9,0 \cdot 10^1$
<i>V. harveyi</i> Ms3	$2,4 \cdot 10^8$	16,0	$4,3 \cdot 10^{-4}$	$1,0 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^5$	$3,6 \cdot 10^{-8}$	$1,8 \cdot 10^2$
<i>Vibrio sp.</i> W3	$1,9 \cdot 10^8$	17,0	$4,7 \cdot 10^{-4}$	$9,0 \cdot 10^4$	$1,7 \cdot 10^3$	$3,6 \cdot 10^{-8}$	$1,1 \cdot 10^3$
<i>Vibrio sp.</i> Mo1	$2,8 \cdot 10^8$	15,0	$3,9 \cdot 10^{-4}$	$1,1 \cdot 10^5$	$2,1 \cdot 10^3$	$4,8 \cdot 10^{-8}$	$1,9 \cdot 10^3$
<i>Vibrio sp.</i> F8	$9,0 \cdot 10^7$	9,0	$5,6 \cdot 10^{-4}$	$5,0 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^2$	$4,0 \cdot 10^{-8}$	$1,3 \cdot 10^3$
<i>Vibrio sp.</i> Sh3	$1,2 \cdot 10^8$	17,0	$8,7 \cdot 10^{-4}$	$1,1 \cdot 10^5$	$9,1 \cdot 10^4$	$4,6 \cdot 10^{-8}$	$3,1 \cdot 10^2$
<i>Vibrio sp.</i> Ms4	$2,4 \cdot 10^8$	15,0	$5,1 \cdot 10^{-4}$	$1,2 \cdot 10^5$	$1,1 \cdot 10^5$	$7,9 \cdot 10^{-8}$	$5,8 \cdot 10^2$
<b>М (среднее)</b>	<b><math>2,1 \cdot 10^8</math></b>	<b>16,1</b>	<b><math>4,9 \cdot 10^{-4}</math></b>	<b><math>9,4 \cdot 10^4</math></b>	<b><math>4,7 \cdot 10^4</math></b>	<b><math>5,0 \cdot 10^{-8}</math></b>	<b><math>7,6 \cdot 10^2</math></b>
<b>±m</b>	<b><math>8,7 \cdot 10^7</math></b>	<b>7,1</b>	<b><math>7,6 \cdot 10^{-4}</math></b>	<b><math>3,2 \cdot 10^4</math></b>	<b><math>6,7 \cdot 10^5</math></b>	<b><math>1,4 \cdot 10^{-8}</math></b>	<b><math>7,9 \cdot 10^2</math></b>

Для штаммов с быстрым типом кинетики наблюдались корреляции между клеточной активностью каталазы (Ед/кл) и удельной активностью люциферазы (мВ/мг) (рис. 3), а также с действующими на биOLUMИНЕСЦЕНЦИЮ бактерий концентрациями (ЭК<sub>50</sub>) перекиси водорода (рис. 4) [7]. При этом удельная каталазная активность *in vitro* (ед/мг) не коррелировала ни с чувствительностью к H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ни с удельной люциферазной активностью. Таким образом, получается, что способность бактерий с быстрым кинетическим типом расщеплять перекись водорода (каталазная активность, Ед/кл), определяется именно внутриклеточной активностью люциферазы, которая значительно выше (в среднем в 28 раз), чем у бактерий с медленным кинетическим типом (таблицы 1, 2).

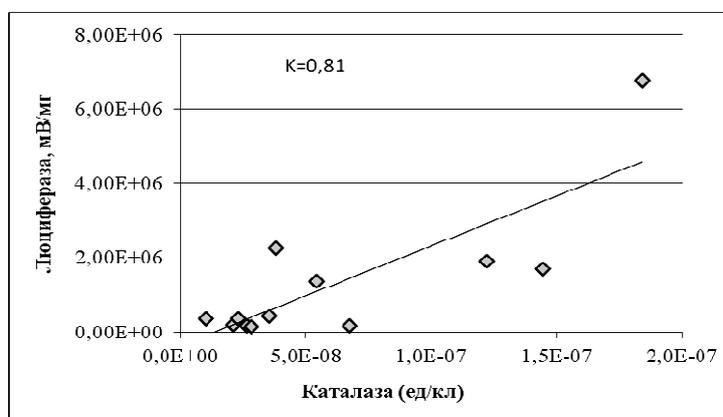


Рис. 3. Корреляция между каталазной активностью клеток светящихся бактерий с быстрой кинетикой люциферазы и люциферазной активностью *in vitro*.

Для штаммов с медленным типом люциферазной кинетики корреляций между клеточными активностями люциферазы и каталазы между собой, а также с чувствительностью биолюминесценции к перекиси водорода не наблюдалось. В тоже время этот тип бактерий проявлял большую устойчивость к действию перекиси водорода. Эффективные концентрации ( $ЭК_{50}$ )  $H_2O_2$  для штаммов с медленным типом кинетики ( $4,06 \cdot 10^{-4} \pm 2,78 \cdot 10^{-4} \%$ ) были в 10–40 раз выше, чем для бактерий с быстрой люциферазной кинетикой ( $4,67 \cdot 10^{-5} \pm 4,06 \cdot 10^{-5} \%$ ). Таким образом, несмотря на меньшую удельную активность люциферазы и практически одинаковую клеточную активность каталазы, группа бактерий с медленным типом кинетики оказалась лучше защищенной от действия перекиси водорода. Это дает возможность предположить наличие у них дополнительных защитных антиоксидантных систем.

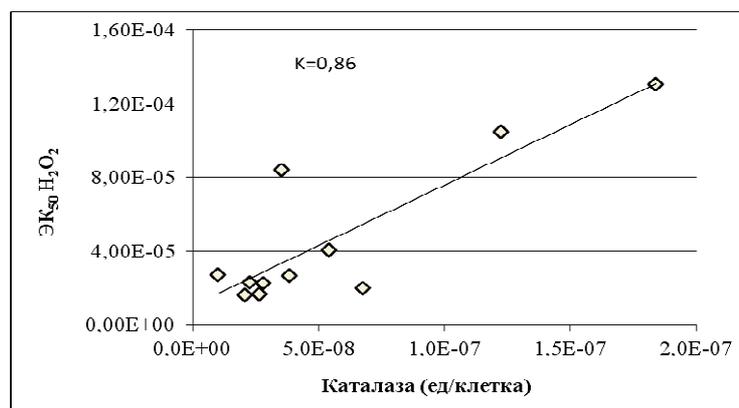


Рис. 4. Корреляция между каталазной активностью клеток светящихся бактерий с быстрой кинетикой люциферазы и чувствительностью бактерий к перекиси водорода.

Так как бактерии с медленной кинетикой способны накапливать большую биомассу, то одним из таких механизмов может быть генетическая регуляция *quorum sensing*, связанная с числом клеток и концентрацией автоиндуктора в среде [1, 2]. Кроме того, анализ усредненных данных ферментативной активности бактерий показывает, что в пересчете на общую клеточную биомассу, штаммы с медленным типом кинетики обладают активностью люциферазы ( $9,40 \cdot 10^4 \pm 2,15 \cdot 10^4$  мВ), практически одинаковой с бактериями с быстрым кинетическим типом ( $1,17 \cdot 10^5 \pm 1,92 \cdot 10^4$  мВ). Наличие при этом более высокой общей каталазной активности, а также каталазаположительные результаты качественного теста (см. выше), дают основание полагать, что антиоксидантная защита бактерий с медленным типом люциферазной кинетики обеспечивается преимущественно каталазой. Синтез этого фермента, по всей видимости, имеет индуцибельный характер и регулируется *quorum sensing*, а также условиями окислительного стресса [8].

Как было показано в многочисленных публикациях, а также в ходе собственных исследований, рост бактерий и их биолюминесценция при различной концентрации

соли происходит не одинаково. Накопление большей биомассы наблюдается при более низкой концентрации соли – хлорида натрия (1,5–2%), когда концентрация кислорода в среде выше, в то время как большая биолуминесценция наблюдается при более высокой концентрации соли (4–5%), при которой концентрация кислорода ниже [1, 6]. Исходя из этого и полученных данных об участии люциферазы в антиоксидантных процессах в клетке, можно предположить следующую схему функционирования люциферазно-каталазной антиоксидантной системы бактерий. При концентрации кислорода, достаточной для роста бактерий (при низкой солености, отсутствии окислительного стресса), включается механизм *quorum sensing*, приводящий к наблюдаемым фенотипам и антиоксидантным свойствам. При более высокой концентрации соли и снижении кислорода, когда достаточного накопления биомассы не происходит и возрастает концентрация активных форм кислорода в клетке, для их детоксикации включается SOS механизм, который приводит к возрастанию активности люциферазы (возможно и каталазы) в клетке, что проявляется в большей интенсивности биолуминесценции.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Показаны отличия ферментативных свойств бактерий с быстрым и медленным типами люциферазной кинетики.
2. Полученные данные указывают на то, что люцифераза, также как и каталаза обладает антиоксидантными свойствами, участвуя в защите бактериальной клетки от окислительного стресса, вызванного перекисью водорода.
3. Предполагается, что у бактерий с быстрым типом люциферазной кинетики большую антиоксидантную роль играет люцифераза, синтез и ферментативная активность которой, регулируется не только генетическим *quorum sensing*, но и SOS механизмом.
4. Бактерии с медленной люциферазной кинетикой, для которых характерно накопления большей биомассы, были лучше защищены от действия перекиси водорода, что связано с более высокой активностью каталазы и участием преимущественно механизма *quorum sensing* в регуляции синтеза ферментов.
5. Предполагается, что одним из факторов переключающих антиоксидантную защиту светящихся бактерий с каталазной на люциферазную, может быть содержание соли в среде. Возможно, что от концентрации соли в среде зависит и запуск генетических механизмов *quorum sensing* и SOS.

### Список литературы

1. Дерябин Д.Г. Бактериальная биолуминесценция: фундаментальные и прикладные аспекты / Д.Г. Дерябин. – М: Наука, 2009. – 248 с.
2. Dunlap P. Biochemistry and Genetics of Bacterial Bioluminescence // Adv Biochem Eng Biotechnol. – 2014. – Vol.144. – P. 37–64. doi: 10.1007/978-3-662-43385-0-2.
3. Haddock S. H.D., Moline M.A., Case J.F. Bioluminescence in the Sea / S. H.D. Haddock, M.A. Moline, J.F. Case // Annu. Rev. Mar. Sci. – 2010. – Vol. 2. – P. 443–493.
4. The origins of marine bioluminescence: Turning oxygen defence mechanisms into deep-sea communication tools / J.F. Rees, B. DeWergifosse, O. Noiset, etc. // J. Exp. Biol. –1998. – Vol. 201. – P. 1211–1221.

5. Кацев А. М. Идентификация светящихся бактерий, выделенных из Черного и Азовского морей / А.М. Кацев, Джон Макемсон // Ученые записки ТНУ им. В.И. Вернадского, серия «Биология, химия». – 2006. – Т. 19, № 4. – С. 111–116.
6. Кацев А. М. Новые термофильные люминесцентные бактерии, выделенные из Азовского моря // Таврический медико-биологический вестник. – 2014. – Т. 17, № 2. – С. 130–142.
7. Katsev A. M. Effects of hydrogen peroxide on light emission by various strains of marine luminescent bacteria / A. M. Katsev, G. Wegrzyn, H. Szpilewska // J. Basic Microbiol. – 2004. – Vol. 44, No. 3. – P. 178–184.
8. Visick K.L., Ruby E.G. The periplasmic, group III catalase of *Vibrio fischeri* is required for normal symbiotic competence and is induced both by oxidative stress and by approach to stationary phase / K.L. Visick, E.G. Ruby // J Bacteriol. – 1998. – Vol. 180, No.8. – P. – 2087–2092.

## **ENZYME ACTIVITY OF BIOLUMINESCENT BACTERIA FROM BLACK AND AZOV SEAS AND THEIR ANTIOXIDANT DEFENSE**

*Katsev A.M.*

*Crimean State Medical University named after S.I. Georgievskiy, Simferopol, Crimea, Russia  
E-mail: katsev@mail.ru*

Previously, effects of hydrogen peroxide on light emission were investigated among various strains of luminescent bacteria. It was found that luminescence of strains with luciferase of fast kinetics of reaction decreased at considerably lower concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> than that of strains with luciferase of the slow kinetics. The action (either direct or indirect) of luciferases as anti-oxidants seemed to be independent of activity of catalase, which was found to be different in various strains. Therefore, it seems that luciferases of the slow kinetics are more efficient in detoxification of reactive oxygen species than those of the fast kinetics.

In this work enzymatic properties included cells' and specific activities of luciferases and catalases of luminous bacteria with different types of luciferase kinetics have been further studied and analyzed. It had been found that bacteria with fast kinetics manifested both higher intensity of cells' bioluminescence and luciferase activity but had lower growth ability in comparison with bacteria with slow kinetics type.

For luminescent bacteria with luciferase of fast kinetics cells' catalase activity were revealed to correlate with specific luciferase activity, as well as with the sensitivity of bacterial bioluminescence to hydrogen peroxide with coefficients 0,81 and 0,86 respectively. For bacteria with a slow luciferase kinetic such correlations were not observed. However they were significantly less sensitive to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> action and therefore stronger protected against oxidation. It has been assumed that luciferase plays the main antioxidant role in bacteria with fast kinetics while bacteria with slow kinetic type use for this purposes both catalase and luciferase (perhaps mostly catalase).

Beside oxidative stress another external factor that may switch bacterial antioxidant defense system from catalase to luciferase was supposed to be salinity. Luminous bacteria is known to be characterized by both lower growth and brighter bioluminescence when grow in a media with high salinity (4–5%). In conditions of lower salinity (1–2 %) bacteria on the contrary produce higher biomass with lower level of bioluminescence.

Perhaps the behavior of luminous bacteria under oxidative stress and in conditions with different salinity connects with two genetic mechanisms: *quorum sensing* that switches on at large number of bacterial cells, as well as SOS regulation that may increase luciferase activity in stress conditions even at lower number of cells.

**Keywords:** luminescent bacteria, reactive oxygen species, luciferase, catalase..

#### References

1. Deryabin D.G. Bacterial bioluminescence: fundamental and application aspects, 248 p. (M: Science, 2009).
2. Dunlap P. Biochemistry and Genetics of Bacterial Bioluminescence, *Adv Biochem Eng Biotechnol.*, **144**:37 (2014); doi: 10.1007/978-3-662-43385-0-2.
3. Haddock S.H.D., Moline M.A., Case J.F. Bioluminescence in the Sea, *Annu. Rev. Mar. Sci.* **2**, 443, (2010).
4. Rees J.F., DeWergifosse B., Noiset O., Dubuisson M., Janssens B., Thompson E.M. The origins of marine bioluminescence: Turning oxygen defence mechanisms into deep-sea communication tools, *J. Exp. Biol.*, **201**, 1211, (1998).
5. Katsev A. M., Makemson J. Identification of luminous bacteria isolated from the Black and Azov Seas, *Sc. Notes of Taurida National V.I. Vernadsky University. Series Biol. and Chem.*, **19** (4), 111 (2006).
6. Katsev A. M., Wegrzyn G., Szpilewska H. Effects of hydrogen peroxide on light emission by various strains of marine luminescent bacteria, *J. Basic Microbiol.*, **44** (3), 178 (2004).
7. Katsev A.M. New thermophilic luminescent bacteria isolated from Azov sea, *Tavrisheskiy Mediko-Biologicheskiy Vestnik*, **13** (2), (2014)
8. Visick K.L., Ruby E.G. The periplasmic, group III\_catalase\_of *Vibrio fischeri* is required for normal symbiotic competence and is induced both by oxidative stress and by approach to stationary phase, *J. Bacteriol.*, **180** (8), 2087, (1998).

Поступила в редакцию 26.10.2014 г

УДК 546.562 + 547.288.3 + 544.175

## СПЕЙСЕРИРОВАННЫЕ КООРДИНАЦИОННЫЕ СОЕДИНЕНИЯ МЕДИ(II) НА ОСНОВЕ САЛИЦИЛИДЕНГИДРАЗОНОВ ИМИНОДИУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

*Конник О.В.<sup>1</sup>, Замниус Е.А.<sup>2</sup>, Гусев А.Н.<sup>2</sup>, Шульгин В.Ф.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>*Севастопольский научно-производственный центр стандартизации, метрологии и сертификации, Севастополь, Россия*

<sup>2</sup>*Таврический национальный университет имени В.И. Вернадского, Симферополь, Республика Крым, Россия  
E-mail: shulvic@gmail.com*

Описаны синтез и результаты исследования методами химического и термогравиметрического анализа, ИКС и ЭПР комплексов меди и цинка с биссалицилиденгидразоном иминодиуксусной кислоты ( $H_4L$ ) состава  $Cu_2L \cdot 2Py \cdot 2CH_3OH$  (**1**) и  $Cu_2LZn(CH_3COO)_2 \cdot 4Py \cdot CH_3OH$  (**2**). Молекулярное строение и кристаллическая структура комплекса **2** изучены методами рентгеноструктурного анализа. В спектрах ЭПР исследованных комплексов регистрируется сверхтонкая структура из семи линий, указывающая на обменное взаимодействие неспаренных электронов с двумя эквивалентными ядрами атомов меди.

**Ключевые слова:** медь(II) комплексы, цинк комплексы, иминодиуксусная кислота, салицилиденгидразон, ЭПР, СТС, рентгеноструктурный анализ.

### ВВЕДЕНИЕ

Аминокислоты являются одним из традиционных объектов исследования современной химии координационных соединений [1]. Среди представителей данного класса повышенный интерес вызывают соединения, в которых две карбоксильные группы связаны через иминогруппу или азотсодержащий гетероцикл. Примером таких пролигандов могут служить иминодиуксусная кислота и 2,6-пиридиндикарбоновая кислота, взаимное расположение карбоксильных групп и атома азота в которых способствует замыканию сопряженных хелатных циклов при комплексообразовании и приводит к прочным координационным соединениям. Модифицирование карбоксильной группы, в частности использование гидразидов и далее гидразонов, в том числе и салицилиденгидразонов, расширяет координирующие способности лигандных систем данного типа. Согласно литературным данным салицилиденгидразоны пиридиндикарбоной и иминодиуксусной кислоты являются удобными лигандами при конструировании трехъядерных комплексов меди(II), а также гексаядерных структур и координационных полимеров [2–4].

В настоящей работе описан синтез биядерного комплекса меди(II) с бис(салицилиденгидразоном) иминодиуксусной кислоты ( $H_4L$ ) и гетероядерного комплекса димеди-цинка на его основе.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

## Синтез исследуемых соединений

$Cu_2L \cdot 2Py \cdot 2CH_3OH$  (**1**). К суспензии 0,81 г (5 ммоль) гидразида иминодиуксусной кислоты в 30 мл метанола добавили 1,35 г (11 ммоль) салицилового альдегида. Реакционную смесь кипятили при перемешивании на магнитной мешалке в течение 2 часов. Образовавшийся осадок оставили на 12 часов. К полученной суспензии добавили 2,0 г (10 ммоль) моногидрата ацетата меди(II) и кипятили при перемешивании. Через 12 часов образовался темно-зеленый осадок, который был отфильтрован и высушен на воздухе. Полученное соединение растворили в минимальном количестве пиридина, раствор вылили в воду (200 мл). Через 24 часа образовавшийся осадок отфильтровали, промыли небольшим количеством спирта и воды, затем высушили на воздухе до постоянной массы. Выход комплекса составляет 85% от теоретически возможного.

Найдено, масс. %: С 50,55; Н 4,16; N 13,59. Для  $C_{30}H_{23}N_7O_6Cu_2$  рассчитано, масс. %: С 51,18; Н 3,27; N 13,93.

$Cu_2LZn(CH_3COO)_2 \cdot 4Py \cdot CH_3OH$  (**2**). К суспензии биядерного комплекса меди(II) с салицилиденгидразоном иминодиуксусной кислоты (**1**) массой 1,1 г (2 ммоль) в 30 мл этанола добавили по каплям пиридин до растворения осадка. К образовавшемуся раствору добавили эквивалентное количество тетрагидрата ацетата цинка (0,51 г, 02 ммоль) и перемешивали смесь при нагревании в течение часа. Полученный раствор отфильтровали и оставили на 24 часа. Образовавшийся осадок отфильтровали, промыли небольшим количеством спирта и высушили на воздухе до постоянной массы. Выход комплекса составляет 60–85% от теоретически возможного.

Найдено, масс. %: С 50,62; Н 4,22; N 12,45. Для  $C_{43}H_{44}Cu_2ZnN_9O_9$  рассчитано, масс. %: С 50,42; Н 4,32; N 12,31.

Анализ на содержание углерода, водорода и азота проводили с использованием анализатора Perkin–Elmer 240 С путем сжигания навески образца в токе кислорода с последующим хроматографированием газообразных продуктов сгорания в токе гелия.

ИК-спектры твердых образцов были записаны в таблетках KBr в интервале 4000–400  $cm^{-1}$  на Фурье-спектрометре *Perkin Elmer Spectrum BX*.

Термогравиметрические кривые получены на Q-дериватографе системы *Паулик-Паулик-Эрдей* в статической воздушной атмосфере, скорость нагревания 10 °С/мин, держатель образца - керамический тигель без крышки, эталон - прокаленный оксид алюминия.

Спектры ЭПР жидких растворов записаны на спектрометре *ADANI PS 100.X* в X-диапазоне. Растворитель смесь толуола с пиридином, в качестве стандарта использовался ДФПГ.

Теоретическое моделирование спектров выполняли с помощью комплекса программ, описанных в монографии [5]. В качестве функции формы линии использовали сумму функций Лоренца и Гаусса. В соответствии с теорией релаксации одноцентровые вклады в ширину линии задавали выражением

$$\Delta H_p = \alpha + \beta m_1 + \gamma m_1^2 \quad (1)$$

где  $m_l$  – проекция ядерного спина;  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$  - параметры ширины линии. Член  $\alpha$  учитывает эффекты уширения, одинаковые для всех линий СТС. Коэффициент  $\beta$  определяется произведением  $g$ -тензора и тензора сверхтонкого взаимодействия. Коэффициент  $\gamma$  определяется анизотропией СТВ и зависит от времени корреляции вращательного движения парамагнитной частицы в жидкости.

При моделировании учитывали также вклад, обусловленный внутримолекулярными движениями в биядерном комплексе

$$\Delta H_p(1,2) = \delta(m_{l1} - m_{l2})^2 \quad (2)$$

Параметры  $g_o$ ,  $a_{Cu}$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  варьировали до достижения минимума функционала ошибки.

$$F = \frac{1}{N} \left[ \sum_{i=1}^N (Y_i^e - Y_i^t)^2 \right] \quad (3)$$

### Рентгеноструктурный анализ

Монокристалл комплекса **2**, выращенного из смеси метанол–пиридин проводился на автоматическом четырехкружном дифрактометре Bruker Smart Apex II, оборудованном ССД камерой (MoK $\alpha$ -излучение, графитовый монохроматор,  $\lambda=0,71073$  Å) с использованием стандартной процедуры [6]. Учет поглощения в кристаллах выполнен по методу азимутального сканирования. Структуры расшифрованы прямым методом и уточнены методом наименьших квадратов в полноматричном анизотропном приближении с использованием комплекса программ SHELXS-97 и SHELXL-97 [7]. Атомы водорода подсажены геометрически и их позиции уточнялись методом "наездника". Детали рентгенографического эксперимента, расшифровки и уточнения структуры приведены табл. 1. Полный набор рентгеноструктурных данных будет задепонирован в Кембриджском банке структурных данных (deposit@ccdc.cam.ac.uk или [http://www.ccdc.cam.ac.uk/data\\_request/cif](http://www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif)).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На термогравиметрической кривой комплекса **1** в интервале температур 60–200 °С наблюдается потеря 9% массы образца, сопровождающаяся эндотермическим эффектом с минимумом на кривой ДТА при 110 °С и соответствующая потере двух молекул метанола. В интервале 200–250 °С наблюдается процесс потери еще 11% массы с минимумом на кривой ДТА при 230 °С, что соответствует потере одной молекулы пиридина. Сразу же после этого начинается термоокислительная деструкция комплекса, плавно переходящей в процесс выгорания органического остатка, который сопровождается широким мощным экзоэффектом с максимумом на кривой ДТА при 400 °С. Процесс завершается при 650 °С и сопровождается потерей 73% массы образца.

Термогравиметрическая кривая комплекса **2** неинформативна ввиду наложения процессов.

Таблица 1

Параметры рентгенографического эксперимента, расшифровки и уточнения структуры комплекса 2

Параметр	Значение
Состав	$[\text{Cu}_2\text{LZn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{Py}] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
Брутто-формула	$\text{C}_{42}\text{H}_{45}\text{Cu}_2\text{N}_9\text{O}_{12}\text{Zn}$
Размеры кристалла, мм	$0,45 \times 0,50 \times 0,30$
$M_r$	1060,32
Сингония	<i>ромбическая</i>
Пр. гр.	<i><math>C2/c</math></i>
$a$ (Å)	31,6974(12)
$b$ (Å)	10,3023(4)
$c$ (Å)	16,4714(7)
$\beta$	119,7460(10)
$Z$	4
$V$ (Å <sup>3</sup> )	4670,1(3)
Температура (К)	296(2)
$\mu$ (mm <sup>-1</sup> )	1,482
$d$ (выч.) (г/см <sup>3</sup> )	1,543
Область $\theta$ (град)	2,11–26,50
Диапазон изменения индексов	$-39 < h < 30$ $-12 < k < 10$ $-20 < l < 20$
Измерено рефлексов	22499
Число независимых отражений	4832
Число рефлексов с $I > 2\sigma(I)$	3513
Число уточняемых параметров	319
$R^*$	0,0382
$R_w^*$	0,1010
GOOF	1,060
$\Delta\rho$ max.; min. (e·Å <sup>-3</sup> )	0,723; -0,523

При образовании комплекса **1** в ИК-спектре исчезает полоса амид-I, проявляющаяся в спектрах салицилиденгидразонов около  $1670\text{ см}^{-1}$ , и появляется полоса с максимумом поглощения при  $1602\text{ см}^{-1}$ , обусловленная валентными колебаниями группировки  $>C=N-N=C<$ . Образование комплекса сопровождается также появлением полосы поглощения с максимумом при  $1548\text{ см}^{-1}$ , отнесенной к валентным колебаниям группировки  $-C(-O-)=N$ .

Димерное строение комплекса подтверждается спектрами ЭПР, в которых при комнатной температуре наблюдается слаборазрешенная СТС от двух эквивалентных ядер меди (рис. 1). Повышение температуры раствора до  $353\text{ К}$  улучшает качество спектра, в котором четко проявляется СТС из семи линий с соотношением интенсивностей  $1:2:3:4:3:2:1$ , свидетельствующая об обменной взаимодействии неспаренных электронов с двумя эквивалентными ядрами меди (рис. 2). Результаты теоретического моделирования спектра (табл. 2) подтверждают димерную модель комплекса.

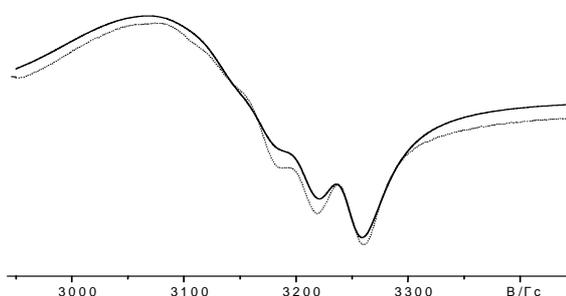


Рис. 1. Спектр ЭПР комплекса **1** при температуре  $293\text{ К}$  (пиридин–толуол). Сплошная линия – экспериментальный спектр, прерывистая линия – теоретически рассчитанный спектр.

Таблица 2

Параметры спектров ЭПР биядерных комплексов **1** и **2**

Соединение	Т, К	$g_o$	$a_{Cu} \cdot 10^4, \text{ см}^{-1}$	Параметры ширины линий, Гс				$\sigma^*$ (%)
				$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\delta$	
<b>1</b>	293	2,119	36,7	43,3	13,1	0,15	0,002	4,6
<b>1</b>	353	2,117	36,6	31,2	3,62	0,83	1,38	4,7
<b>2</b>	353	2,118	34,1	26,8	6,65	3,49	0,00	3,9

\*) Ошибка, характеризующая отклонение экспериментального спектра от теоретического.

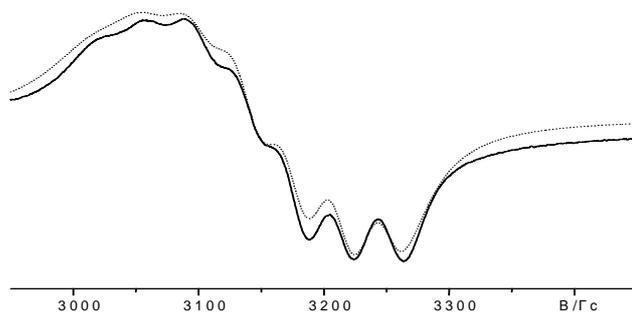
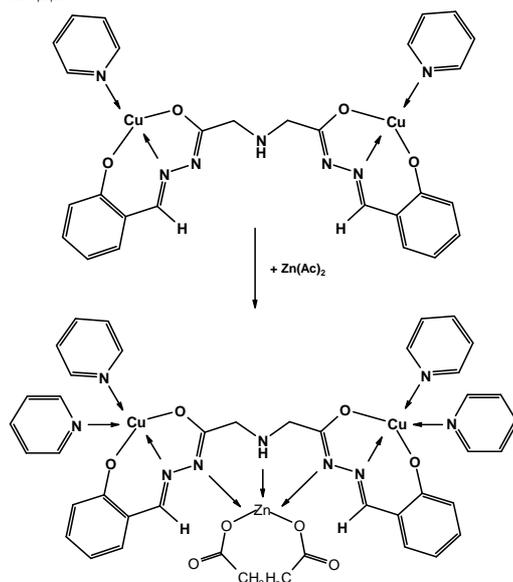


Рис. 2. Спектр ЭПР комплекса **1** при температуре 353 К (пиридин-толуол(сплошная линия – экспериментальный спектр, прерывистая линия – теоретически рассчитанный спектр).

Наличие в комплексе **1** незадействованных донорных центров позволяет использовать его как удобный синтон при конструировании трехядерных координационных соединений. Так, при взаимодействии комплекса **1** с ацетатом цинка был получен трехядерный комплекс **2**, содержащий гетерометальную цепочку медь…цинк…медь.



Соединение **2** изучено методами химического и термического анализа, а также ИК-спектроскопии поглощения. Поскольку установить его строение с помощью косвенных методов не представляется возможным, был выполнен рентгеноструктурный анализ монокристалла, выращенного перекристаллизацией из

метанола с добавлением небольшого количества пиридина. Общий вид молекулы представлен на рис. 3.

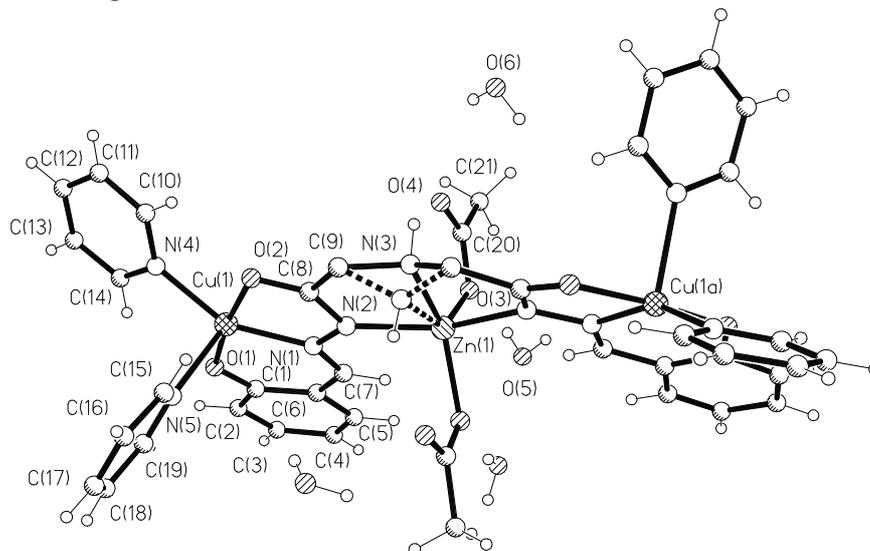


Рис. 3. Молекулярное строение комплекса  $\text{Cu}_2\text{LZn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{Py} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (**2**).

Длины связей, образованных с участием катионов металлов: Zn(1)–O(3) 2,0388(19); Zn(1)–N(2) 2,076(2); Zn(1)–N(3) 2,139(5); Zn(1)–O(3) 2,0388(19); Zn(1)–N(2) 2,076(2); Zn(1)–N(3) 2,139(5); Cu(1)–O(1) 1,903(2); Cu(1)–O(2) 1,9900(19); Cu(1)–N(5) 2,279(3); Cu(1)–N(1) 1,940(2); Cu(1)–N(4) 2,042(2) Å.

Комплекс имеет молекулярное строение, четыре молекулы воды расположены во внешней сфере и связаны прочными водородными связями друг с другом и атомами кислорода координированных цинком ацетат-анионов. Длины связей, образованных катионами меди(II) и цинка с донорными атомами лигандов, имеют обычные значения [8]. В пределах обычных значений лежат также длины связей и валентные углы бинуклеирующего лиганда и ацетат-аниона [9]. Координационный полиэдр катиона меди(II) может быть описан как слегка искаженная тетрагональная пирамида. Атом меди выходит из основания пирамиды на 0,264 Å в сторону атома азота, образующего вершину. Хелатные циклы несколько изогнуты и некопланарны, угол между ними составляет 6,1°.

Координационный полиэдр катиона цинка представляет собой сильно искаженную тригональную бипирамиду с атомами азота N(2) и N(2)', образующими ее вершины. Иминный атом азота N(3) и связанный с ним атом водорода разупорядочны по двум позициям вокруг оси второго порядка. Ацетат-анионы монодентатно связаны с катионом цинка, длины связей кислород-углерод заметно отличаются друг от друга.

В спектре ЭПР раствора медно-цинкового комплекса **2** при комнатной температуре наблюдается слабо разрешенный сигнал из семи линий СТС с параметрами эффективного спинового гамильтониана, близкими к таковым для

исходного спейсированного димера меди (табл. 2). Повышение температуры до 353 К повышает разрешение спектра и семь линий уже видны отчетливо. Величины  $g$ -фактора и константы СТС комплексов **1** и **2** различаются незначительно, что свидетельствует либо об отщеплении ацетата цинка в растворе, либо о слабом влиянии диамагнитного катиона цинка на обменные каналы в случае сохранения трехъядерной структуры. В то же время, комплексы заметно отличаются параметрами ширины линий, что свидетельствует в пользу сохранения трехъядерного строения. Особенно это касается параметра  $\delta$ , отвечающего за внутримолекулярные движения координационных полиэдров меди друг относительно друга; в комплексе **2** он практически обращается в нуль. Очевидно, что катион цинка, координируя донорные атомы азота двух моноядерных субъединиц, препятствует их движению друг относительно друга.

Спектр раствора комплекса **2**, замороженного при 77 К, имеет вид, типичный для систем с аксиальной симметрией ( $g_{\parallel}=2,04$ ;  $g_{\perp}=2,30$ ). При этом в области параллельной ориентации хорошо проявляется СТС от двух эквивалентных ядер меди ( $A_{\parallel}=120$  Гс) (рис. 5).

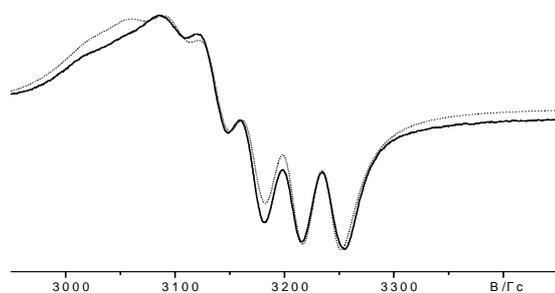


Рис. 4. Спектр ЭПР раствора комплекса **2** при температуре 353 К (пиридин–толуол) (сплошная линия – экспериментальный спектр, прерывистая линия – теоретически рассчитанный спектр).

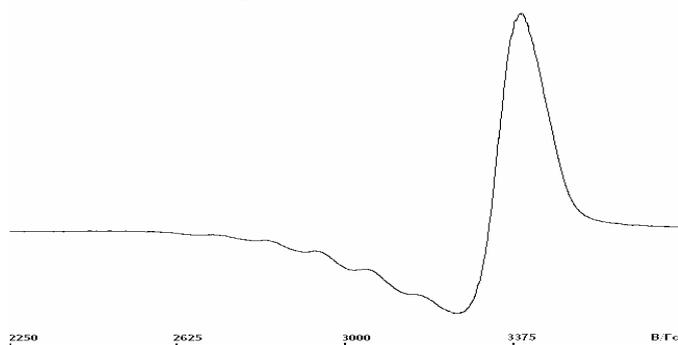


Рис. 5. Спектр ЭПР замороженного раствора комплекса **2** при температуре 77 К (пиридин–толуол).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Синтезированы и исследованы координационные соединения меди(II) и цинка с биссалицилиденгидразоном иминодиуксусной кислоты ( $H_4L$ ) состава  $Cu_2L \cdot 2Py \cdot 2CH_3OH$  (**1**) и  $Cu_2LZn(CH_3COO)_2 \cdot 4Py \cdot CH_3OH$  (**2**).
2. Строение синтезированных комплексов однозначно подтверждено данными спектроскопии ЭПР и рентгеноструктурного анализа.
3. В спектрах ЭПР исследуемых комплексов наблюдается сверхтонкая структура из семи линий, свидетельствующая об обменном взаимодействии неспаренных электронов с двумя эквивалентными ядрами меди.

### Список литературы

1. Манорик П.А. Разнолигандные биокоординационные соединения металлов в химии, биологии, медицине / П.А. Манорик. – К.: Наукова думка, 1991. – 270.
2. Synthesis, electrochemical and magnetic properties of  $Cu_3$  complexes of a series of new compartmental trinucleating ligands  $H_4L$  / X. Chen, S. Zhan, C. Hu [et al.] // Dalton Trans. – 1997, No 1. – P. 245–250.
3. Trinuclear complexes of a series of 'tridentate' hydrazide ligands - structural and magnetic properties / V.A. Milway, L. Zhao, T.S.M. Abedin [et al.] // Polyhedron. – 2003. – Vol. 22. – P. 1271–1279.
4. Adams H. A coordination polymer derived from the copper(II) complex of a bis-(salicylhydrazone) derived from iminodiacetic acid diethyl ester / H. Adams, D. E. Fenton, G. Minardi // Inorganic Chemistry Communications. – 2000. – Vol. 3, No 1. – P. 24–28.
5. Ларин Г.М. Обменные взаимодействия в биядерных комплексах меди(II) с ацилдигидразонами предельных дикарбоновых кислот / Г.М. Ларин, В.В. Минин, В.Ф. Шульгин // Успехи химии. – 2008. – Т. 77, № 5. – С. 477–491.
6. SMART (Control) and SAINT (Integration) Software, Version 5.0, Bruker AXS Inc., Madison(WI), 1997.
7. Sheldrick G.M. A short history of SHELX / G.M. Sheldrick // Acta Crystallogr. – 2008. – Vol. A64. – P. 112–122.
8. Tables of bond lengths determined by X-Ray and neutron diffraction. Part 2. Organometallic compounds and co-ordination complexes of the d- and f-block metals / G. Orpen, L. Brammer, F.H.Allen [et al.] // J. Chem. Soc. Dalton Trans. – 1989. – Suppl. – P. S1–S83.
9. Tables of bond lengths determined by X-Ray and neutron diffraction. Part 1 / Bond lengths in organic compounds / F.H. Allen, O. Kennard, D.G. Watson [et al.] // J. Chem. Soc. Perkin Trans. II. – 1987. – Suppl. – P. S1–S19.

### SPACER ARMED COPPER(II) COORDINATION COMPOUNDS ON BASIS OF IMINODIACETIC AND SALICYLIDENHYDRAZONE

*Konnik O.V., Zamnius E.A., Gusev A.N., Shul'gin V.F.*

*Taurida National V.I. Vernadsky University, Simferopol, Crimea, Russia  
E-mail: shulvic@gmail.com*

Synthesis and studies of copper(II) and zinc complexes on iminodiacetic acid salicylidenhydrazone ( $H_4L$ ) basis composition  $Cu_2L \cdot 2Py \cdot 2CH_3OH$  (**1**) and  $Cu_2LZn(CH_3COO)_2 \cdot 4Py \cdot CH_3OH$  (**2**) by elemental and thermogravimetric analysis, IR- and EPR-spectroscopy are describe.

$\text{Cu}_2\text{L}\cdot 2\text{Py}\cdot 2\text{CH}_3\text{OH}$  was synthesized by iminodiacetic acid's salicylidenhydrazone and copper(II) acetate reaction in methanol solution at pyridine presence. Heteronuclear complex  $\text{Cu}_2\text{LZn}(\text{CH}_3\text{COO})_2\cdot 4\text{Py}\cdot \text{CH}_3\text{OH}$  by reaction  $\text{Cu}_2\text{L}\cdot 2\text{Py}\cdot 2\text{CH}_3\text{OH}$  and zinc acetate in ethanol – pyridine mixture was obtained. The composition of complexes was determined by elemental (C, H, and N) analysis, the coordination mode of ligand were studied by IR-spectroscopy data. The structure of complex **2** was studied by X-Ray analysis. The complex has a molecular structure, four water molecules are located in the outer sphere position, and are bounded by strong H-bonds with each other and the oxygen atoms of the acetate anions that are coordinated at zinc. The coordination polyhedron of the copper (II) cation has a slightly distorted tetragonal pyramid geometry. The coordination polyhedron of the zinc cation is strongly distorted trigonal bipyramid with the nitrogen atoms which form its vertex. Imine nitrogen atom and hydrogen atom that is bonded with it are disordered at two positions around the second order axe. Acetate anions are monodentate bonded to the zinc cation.

Poor resolved HFS from two equivalent copper nuclei for both complexes are observed in the EPR spectra at room temperature. Increasing the temperature of the solution to 353 K improves the quality of the spectrum, which clearly manifested HFS at seven lines with an intensity ratio of 1: 2: 3: 4: 3: 2: 1, which is strong argument about exchange interaction of the unpaired electron. Theoretical modelling leads to such results:  $g_o = 2,117$  and  $a_{\text{Cu}} = 36,6\cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$  (for complex 1),  $g_o = 2,118$  and  $a_{\text{Cu}} = 34,1\cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$  (for complex 2).

The spectrum of the frozen solution of complex **2** at 77 K, has a form typical for axial symmetry systems ( $g_{\parallel} = 2,04$  and  $g_{\perp} = 2,30$ ). At the same time in parallel orientation is clearly seen HFS from two equivalent copper nuclei ( $A_{\parallel} = 120 \text{ G}$ ).

**Keywords:** copper(II) complexes, zinc complexes, iminodiacetic acid, salicylidenhydrazone, EPR, HFS, X-Ray analysis.

#### Reference

1. Manorik P.A. Ternary biocoordination compounds in chemistry, biology, medicine, *Naukova Dumka*, 270 (1991). (in Russ.).
2. Chen X., Zhan S., Hu C., Synthesis, electrochemical and magnetic properties of  $\text{Cu}_3$  complexes of a series of new compartmental trinucleating ligands  $\text{H}_4\text{L}$ , *Dalton Trans.*, (1), 245 (1997).
3. Milway, L. Zhao V.A., Abedin T.S.M., Trinuclear complexes of a series of 'tritopic' hydrazide ligands - structural and magnetic properties, *Polyhedron*, **22**, 1271 (2003).
4. Adams H., Fenton D. E., Minardi G, A coordination polymer derived from the copper(II) complex of a bis-(salicylhydrazone) derived from iminodiacetic acid diethyl ester, *Inorganic Chemistry Communications*, **3** (1), 24 (2000).
5. Larin G.M., Minin V.V., Shul'gin V.F., Exchange interactions in binuclear copper(II) complexes on dicarboxylic acid's acyldihydrazones basis, *Russ Chem Rev*, **77** (5), 451 (2008).
6. SMART (Control) and SAINT (Integration) Software, Version 5.0, Bruker AXS Inc., Madison(WI), (1997).
7. Sheldrick G.M., A short history of SHELX, *Acta Crystallogr*, **A64**, 112 (2008).
8. Orpen G., Brammer L., Allen F.H., Tables of bond lengths determined by X-Ray and neutron diffraction. Part 2. Organometallic compounds and co-ordination complexes of the d- and f-block metals, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, S1 (1989).
9. Allen F.H., Kennard O., Watson D.G., Tables of bond lengths determined by X-Ray and neutron diffraction. Part 1. Bond lengths in organic compounds, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, S1 (1987).

Поступила в редакцию 30.09.2014 г.

УДК 547.918:547.551.525.211.1:543.42

## СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ТРИТЕРПЕНОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ ПЛЮЩА И СОЛОДКИ СО СТРЕПТОЦИДОМ

Яковишин Л.А.<sup>1</sup>, Гришкова В.И.<sup>2</sup>, Корж Е.Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Севастопольский национальный технический университет, Севастополь, Россия

<sup>2</sup>Таврический национальный университет имени В.И. Вернадского, Симферополь, Россия

E-mail: chemsevntu@rambler.ru

Впервые методом спектрофотометрии исследовано комплексообразование моноаммонийной соли глицирризиновой кислоты (глицирама),  $\alpha$ -хедерина (3-*O*- $\alpha$ -*L*-рамнопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)-*O*- $\alpha$ -*L*-арабинопиранозида хедерагенина) и хедерасопонина С (3-*O*- $\alpha$ -*L*-рамнопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)-*O*- $\alpha$ -*L*-арабинопиранозил-28-*O*- $\alpha$ -*L*-рамнопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*- $\beta$ -*D*-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 6)-*O*- $\beta$ -*D*-глюкопиранозидом хедерагенина) со стрептоцидом в водных растворах при pH 7,2. Показано, что  $\alpha$ -хедерин, хедерасопонин С и глицирам образуют со стрептоцидом комплексы состава 1:1. Определены константы устойчивости комплексов. Рассчитаны свободные энергии Гиббса процессов комплексообразования.

**Ключевые слова:** тритерпеновые гликозиды, глицирризиновая кислота, глицирам,  $\alpha$ -хедерин, хедерасопонин С, стрептоцид, молекулярный комплекс, спектрофотометрия, константа устойчивости.

### ВВЕДЕНИЕ

Стрептоцид (сульфаниламид, Str, рис. 1) относится к группе сульфаниламидных лекарственных препаратов. Он плохо растворим в воде. Оказывает противомикробное действие по отношению к стрептококкам, гонококкам, кишечной палочке и прочим бактериям. Его применяют для лечения различных инфекционных заболеваний [1]. Молекулярное капсулирование лекарственных веществ растительными тритерпеновыми гликозидами является перспективным методом снижения их побочных эффектов и повышения растворимости [2–4]. Описаны молекулярные комплексы ряда сульфаниламидов с глицирризиновой кислотой (3-*O*- $\beta$ -*D*-глюкуронопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)-*O*- $\beta$ -*D*-глюкуронопиранозидом глицирретиновой кислоты), являющейся преобладающим тритерпеновым гликозидом корней солодки *Glycyrrhiza glabra* L. [5], и ее моноаммонийной солью (глицирамом, GC, рис. 1) [6]. Недавно получены молекулярные комплексы тритерпеновых гликозидов плющей  $\alpha$ -хедерина (3-*O*- $\alpha$ -*L*-рамнопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)-*O*- $\alpha$ -*L*-арабинопиранозида хедерагенина, гликозид **1**, рис. 1) и хедерасопонина С (3-*O*- $\alpha$ -*L*-рамнопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)-*O*- $\alpha$ -*L*-арабинопиранозил-28-*O*- $\alpha$ -*L*-рамнопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*- $\beta$ -*D*-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 6)-*O*- $\beta$ -*D*-глюкопиранозида хедерагенина, гликозид **2**, рис. 1) с Str в среде органических растворителей [7]. При этом образование комплексов было подтверждено методом масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением.

Комплексообразование Str с тритерпеновыми гликозидами в водных растворах ранее не рассматривалось. В настоящей статье приведены результаты спектрофотометрического исследования молекулярных комплексов.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использовали образец GC фирмы Calbiochem (США). Тритерпеновые 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 [8, 9].

УФ-спектры получены при температуре 25 °С на спектрофотометре Unico UV-Vis 4802 (США) в кварцевых кюветках ( $l=1$  см). Для составления изомолярных серий использовали  $10^{-4}$  М водные растворы Str, GC и гликозидов **1** и **2** (рН 7,2, фосфатный буфер  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{--NaH}_2\text{PO}_4$ ). Полученные смеси выдерживали при температуре 25 °С в течение 40 мин при постоянном перемешивании.

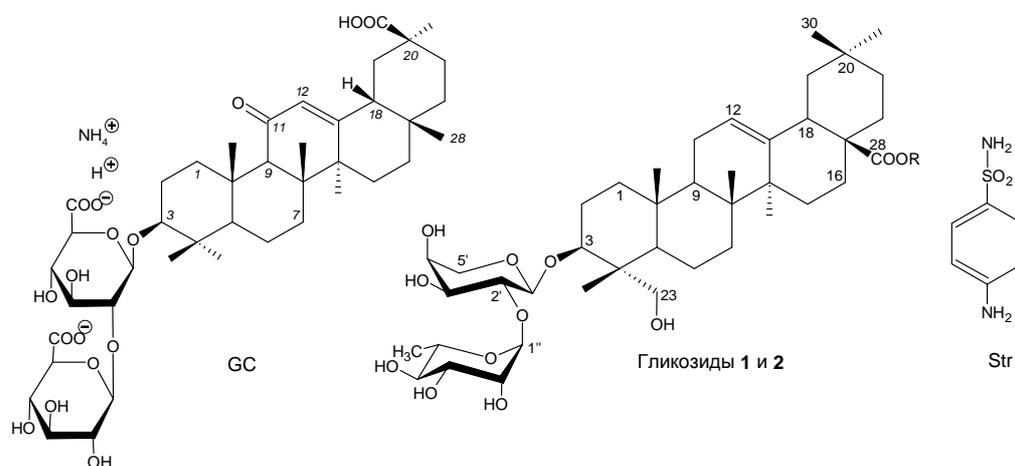


Рис. 1. Стрептоцид (Str), моноаммонийная соль глицирризиновой кислоты (глицирам, GC) и гликозиды  $\alpha$ -хедерин (**1**; R=H) и хедерасопонин С (**2**; R= $\leftarrow\beta\text{Glc}_p$ - $(6\leftarrow 1)\text{-}\beta\text{Glc}_p$ - $(4\leftarrow 1)\text{-}\alpha\text{Rha}_p$ ).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Состав комплексов Str с тритерпеновыми гликозидами плюща и солодки определен методом изомолярных серий (методом Остромысленского–Жоба) [10]. Изомолярные кривые, полученные для смесей Str с гликозидами плюща **1** и **2**, приведены на Рис. 2 и 3. Для компонентов комплексов гликозидов **1** и **2** получены молярные соотношения  $\approx 1,0$ , которые указывают на состав комплексов, равный 1:1. Ранее в масс-спектрах с ионизацией электрораспылением в режиме отрицательных ионов были идентифицированы пики ионов  $[\text{M}^1 + \text{M}^{\text{Str}} - \text{H}]^-$  ( $m/z$  921,78) и  $[\text{M}^2 + \text{M}^{\text{Str}} - \text{H}]^-$  ( $m/z$  1394,06), также принадлежащие комплексам состава 1:1 [7].

Супрамолекулярные комплексы состава 1:1 были описаны для гликозидов **1** и **2** и с рядом других лекарственных веществ [11–13].

Аналогично установлен состав комплекса Str с GC (рис. 4). Для него также получено молярное соотношение компонентов  $\approx 1,0$ , что отвечает составу комплекса 1:1. Комплексы подобного состава были получены для глицирризиновой кислоты и GC с некоторыми биологически активными веществами [3, 4, 11–13].

Спектр поглощения изомолярной серии Str с гликозидом **1** обладает изобестической точкой при 220 и 303 нм, с гликозидом **2** – при 303 нм, а с GC – при 240 нм. Наличие изобестической точки указывает на формирование лишь одного типа комплекса между веществами.

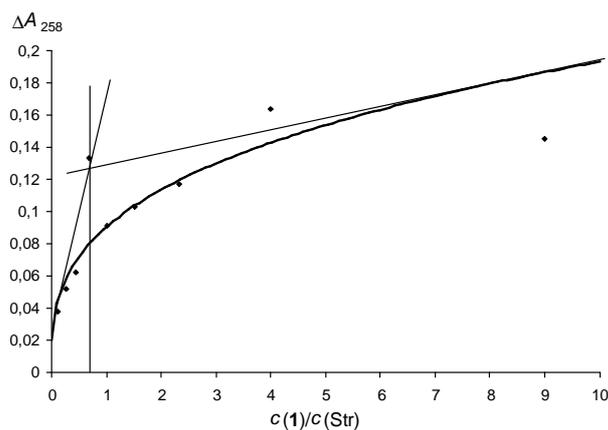


Рис. 2. Зависимость изменения оптической плотности  $\Delta A$  от соотношения компонентов изомолярной серии при  $\lambda=258$  нм ( $c(\text{Str})=10^{-4}$  М,  $c(\mathbf{1})=10^{-4}$  М, pH 7,2).

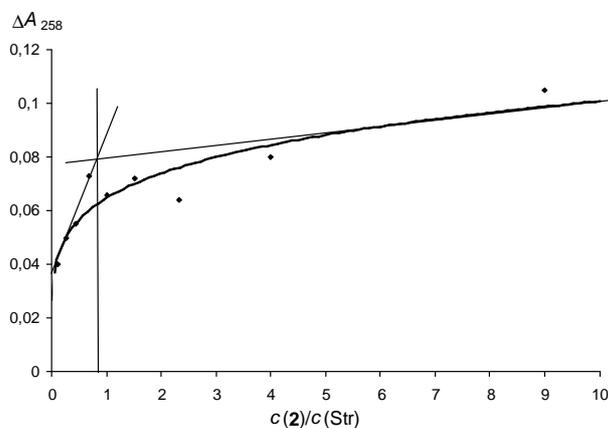
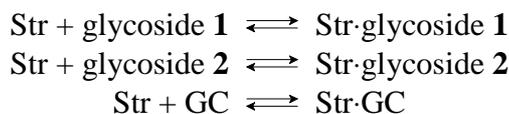


Рис. 3. Зависимость изменения оптической плотности  $\Delta A$  от соотношения компонентов изомолярной серии при  $\lambda=258$  нм ( $c(\text{Str})=10^{-4}$  М,  $c(\mathbf{2})=10^{-4}$  М, pH 7,2).

В растворах устанавливаются равновесия между Str и гликозидами следующего вида:



$$K_{\text{Str-1}} = \frac{[\text{Str}\cdot\text{glycoside 1}]}{[\text{Str}][\text{glycoside 1}]}; K_{\text{Str-2}} = \frac{[\text{Str}\cdot\text{glycoside 2}]}{[\text{Str}][\text{glycoside 2}]}; K_{\text{Str-GC}} = \frac{[\text{Str}\cdot\text{GC}]}{[\text{Str}][\text{GC}]}, \quad (1)$$

где  $K_{\text{Str-1}}$ ,  $K_{\text{Str-2}}$  и  $K_{\text{Str-GC}}$  – константы равновесия, являющиеся константами устойчивости соответствующих комплексов.

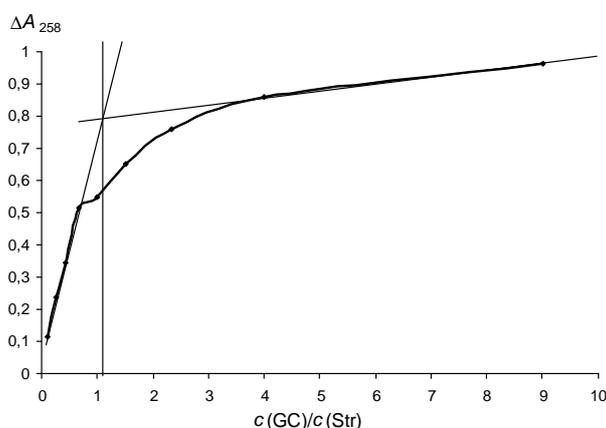


Рис. 4. Зависимость изменения оптической плотности  $\Delta A$  от соотношения компонентов изомолярной серии при  $\lambda=258$  нм ( $c(\text{Str})=10^{-4}$  М,  $c(\text{GC})=10^{-4}$  М, pH 7,2).

На основе изомолярных кривых по формуле 2 были рассчитаны константы устойчивости комплексов  $K$  по методу [14], применимому для комплексов состава 1:1 (табл. 1).

$$K = \frac{\Delta A_0 \Delta A_1}{c(\Delta A_0 - \Delta A_1)^2}, \quad (2)$$

где  $c$  – концентрация вещества, М,  $\Delta A_0$  – изменение оптической плотности, соответствующее комплексу при полном отсутствии диссоциации, а  $\Delta A_1$  – изменение оптической плотности, соответствующее значению на фактической кривой.

Свободная энергия Гиббса  $\Delta G$  для процессов комплексообразования определена по формуле 3. Результаты расчетов  $K$  и  $\Delta G$  приведены в табл. 1.

$$\Delta G = -2,3RT \lg K. \quad (3)$$

Комплекс Str с гликозидом **2** является наиболее устойчивым, т.к.  $K_{Str-1} < K_{Str-GC} < K_{Str-2}$  (табл. 1). Аналогичное соотношение  $K$  было установлено нами и для комплексов данных гликозидов с парацетамолом [12]. У ранее полученных комплексов лекарственных веществ состава 1:1, включающих GC и гликозиды **1** и **2**,  $K$  были равны  $10^4$ – $10^7$   $M^{-1}$  [3, 4, 11–13].

При образовании комплексов могут происходить взаимодействия аминогрупп Str с карбоксильными и гидроксильными группами гликозидов.

**Таблица 1**  
**Термодинамические параметры комплексообразования Str с GC и гликозидами плюща 1 и 2 в водных растворах при 25 °С (рН 7,2)**

Комплекс	$K, M^{-1}$	$\Delta G, Дж/моль$
Str-1	$4,32 \cdot 10^4$	$-2,64 \cdot 10^4$
Str-2	$2,48 \cdot 10^5$	$-3,07 \cdot 10^4$
Str-GC	$8,79 \cdot 10^4$	$-2,82 \cdot 10^4$

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Впервые получены комплексы тритерпеновых гликозидов плюща и солодки с Str в водных растворах при рН 7,2. Комплексообразование исследовано спектрофотометрически.
2. Методом изомольярных серий установлено, что супрамолекулярные комплексы Str с GC и гликозидами плюща **1** и **2** имеют состав 1:1.
3. Рассчитаны  $K$  комплексов гликозидов с Str. Показано, что  $K_{Str-1} < K_{Str-GC} < K_{Str-2}$ .

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 14-43-01031 р\_юг\_a).

#### Список литературы

1. Машковский М.Д. Лекарственные средства: в 2 т. / М.Д. Машковский. – [13-е изд.]. – Харьков: Торсинг, 1997. – Т. 2. – 592 с.
2. Толстикова Т.Г. На пути к низкодозным лекарствам / Т.Г. Толстикова, А.Г. Толстиков, Г.А. Толстиков // Вестник РАН. – 2007. – Т. 77, № 10. – С. 867–874.
3. Tolstikova T.G. The complexes of drugs with carbohydrate-containing plant metabolites as pharmacologically promising agents / T.G. Tolstikova, M.V. Khvostov, A.O. Bryzgalov // Mini Rev. Med. Chem. – 2009. – Vol. 9, № 11. – P. 1317–1328.
4. Polyakov N.E. Glycyrrhizic acid as a novel drug delivery vector: synergy of drug transport and efficacy / N.E. Polyakov, T.V. Leshina // Open Conf. Proc. J. – 2011. – Vol. 2. – P. 64–72.
5. Комплексные соединения глицирризиновой кислоты с противомикробными препаратами / Р.М. Кондратенко, Л.А. Балтина, С.Р. Мустафина [и др.] // Хим.-фарм. журн. – 2003. – Т. 37, № 9. – С. 32–35.
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. Масс-спектрометрическое исследование молекулярного комплексообразования растительных

- гликозидов со стрептоцидом (сульфаниламидом) / А.В. Лекарь, Е.В. Ветрова, Н.И. Борисенко [и др.] // Химия растит. сырья. – 2011. – № 2. – С. 103–106.
8. Тритерпеновые гликозиды *Hedera taurica* I. Строение таурозида E из листьев *Hedera taurica* / А.С. Шашков, В.И. Гришковец, А.А. Лолойко [и др.] // Химия природ. соедин. – 1987. – № 3. – С. 363–366.
  9. Тритерпеновые гликозиды *Hedera canariensis* I. Строение гликозидов L-A, L-B<sub>1</sub>, L-B<sub>2</sub>, L-C, L-D, L-E<sub>1</sub>, L-G<sub>1</sub>, L-G<sub>2</sub>, L-G<sub>3</sub>, L-G<sub>4</sub>, L-H<sub>1</sub>, L-H<sub>2</sub> и L-I<sub>1</sub> из листьев *Hedera canariensis* / В.И. Гришковец, Д.Ю. Сидоров, Л.А. Яковичин [и др.] // Химия природ. соедин. – 1996. – № 3. – С. 377–383.
  10. Булатов М.И. Практическое руководство по фотометрическим методам анализа / М.И. Булатов, И.П. Калинин. – [5-е изд.]. – Л.: Химия, 1986. – 432 с.
  11. Спектрофотометрия супрамолекулярних комплексів тритерпенових глікозидів плюща і солодкою з левоміцетином (хлорамфеніколом) / Л.О. Яковичин, О.М. Корж, О.Д. Дегтяр, А.В. Клименко // Укр. Bioorg. Acta. – 2013. – Т. 11, № 1. – С. 33–36.
  12. Супрамолекулярные комплексы тритерпеновых гликозидов солодки и плюща с парацетамолом / Л.А. Яковичин, В.И. Гришковец, Е.Н. Корж [и др.] // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Сер. «Биология, химия». – 2013. – Т. 26 (65), № 3. – С. 335–342.
  13. Молекулярные комплексы тритерпеновых гликозидов плюща и солодки с доксорубицином / Л.А. Яковичин, В.И. Гришковец, А.В. Клименко [и др.] // Хим.-фарм. журн. – 2014. – Т. 48, № 6. – С. 37–40.
  14. Бабко А.К. Физико-химический анализ комплексных соединений в растворах / А.К. Бабко. – К.: Изд-во АН УССР, 1955. – 328 с.

## SUPRAMOLECULAR COMPLEXES OF LICORICE AND IVY TRITERPENE GLYCOSIDES WITH STREPTOCID

*Yakovishin L.A.<sup>1</sup>, Grishkovets V.I.<sup>2</sup>, Korzh E.N.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Sevastopol National Technical University, Sevastopol, Russia*

<sup>2</sup>*Taurida V.I. Vernadsky National University, Simferopol, Russia*

*E-mail: chemseventu@rambler.ru*

Streptocid (sulfanilamide, Str) belongs to the group of sulfanilamide drugs. It is poorly soluble in water. It acts as antimicrobial to streptococcus, gonococcus, *E. coli*, and other bacteria. It is used for treatment of various infectious diseases. Molecular encapsulation of drugs by plant triterpene glycosides is the perspective method for reducing therapeutic doses of drugs, and increasing their solubility.

Complexes of some sulfanyl amides with glycyrrhizic acid (3-*O*- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-*O*- $\beta$ -D-glucuronopyranoside of 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid) and its monoammonium salt (glycyram, GC) are described. Molecular complexes of Str with triterpene glycosides from ivy  $\alpha$ -hederin (hederagenin 3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-*O*- $\alpha$ -L-arabinopyranoside, glycoside **1**) and hederasaponin C (hederagenin 3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-*O*- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-28-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside, glycoside **2**) were previously obtained in organic solvents.

We prepared molecular complexes of ivy and licorice triterpene glycoside with Str in aqueous solutions at pH 7,2 (phosphate buffer). Using a method of spectrophotometry, the

complexation of Str with **1**, **2** and GC was investigated for the first time. Triterpene glycosides from ivy **1** and **2** form complexes with Str in the 1:1 molar proportion. GC make complex of 1:1 composition.

Absorption spectra of isomolar series for mixtures of Str with **1** have isobestic points at 220 and 303 nm, with **2** – at 303 nm, and with GC – at 240 nm. The presence of isobestic point indicates on forming only of one type of complex.

Stability constants for complexes  $K_s(\text{Str}\cdot\mathbf{1})=4,32\cdot 10^4$ ,  $K_s(\text{Str}\cdot\mathbf{2})=2,48\cdot 10^5$  and  $K_s(\text{Str}\cdot\text{GC})=8,79\cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$  were determined. Gibbs's free energies of complexation processes are calculated.

**Keywords:** triterpene glycosides, glycyrrhizic acid, glycyram,  $\alpha$ -hederin, hederasaponin C, streptocid, molecular complex, spectrophotometry, stability constant.

### Reference

1. Mashkovskii M.D., *Drugs*, 2 vols., 13 ed., **2**, 598 p. (Torsing, Kharkov, 1997). (in Russ.).
2. Tolstikova T.G., Tolstikov A.G., Tolstikov G.A., On the way to low-dose drugs, *Vestnik RAN*, **77** (10), 867 (2007).
3. Tolstikova T.G., Khvostov M.V., Bryzgalov A.O., The complexes of drugs with carbohydrate-containing plant metabolites as pharmacologically promising agents, *Mini Rev. Med. Chem.*, **9** (11), 1317 (2009).
4. Polyakov N.E., Leshina T.V., Glycyrrhizic acid as a novel drug delivery vector: synergy of drug transport and efficacy, *Open Conf. Proc. J.*, **2**, 64 (2011).
5. Kondratenko R.M., Baltina L.A., Mustafina S.R., Ismagilova A.F., Zarudii F.S., Davydova V.A., Bazekin G.V., Suleimanova G.F., Tolstikov G.A., Complex compounds of glycyrrhizic acid with antimicrobial drugs, *Khim.-Farm. Zh.*, **37** (9), 32 (2003).
6. Dalimov D.N., Isaev Yu.T., Saiitkulov A.M., Molecular complexes of ammonium glycyrrhizate with certain medicinal agents and their interferon-inducing activity, *Khim. Prirod. Soedin.*, **2**, 132 (2001).
7. Lekar A.V., Vetrowa E.V., Borisenko N.I., Yakovishin L.A., Grishkovets V.I., Mass spectrometric study on plant glycosides molecular complexation with streptocid (sulphonylamide), *Khim. Rastit. Syr'ja*, **2**, 103 (2011).
8. Shashkov A.S., Grishkovets V.I., Loloyko A.A., Chirva V.Ya., Triterpene glycosides of *Hedera taurica* I. Structure of tauroside E from the leaves of *Hedera taurica*, *Khim. Prirod. Soedin.*, **3**, 363 (1987).
9. Grishkovets V.I., Sidorov D.Yu., Yakovishin L.A., Arnautov N.N., Shashkov A.S., Chirva V.Ya., Triterpene glycosides of *Hedera canariensis* I. Structures of glycosides L-A, L-B<sub>1</sub>, L-B<sub>2</sub>, L-C, L-D, L-E<sub>1</sub>, L-G<sub>1</sub>, L-G<sub>2</sub>, L-G<sub>3</sub>, L-G<sub>4</sub>, L-H<sub>1</sub>, L-H<sub>2</sub>, and L-I<sub>1</sub> from the leaves of *Hedera canariensis*, *Khim. Prirod. Soedin.*, **3**, 377 (1996).
10. Bulatov M.I., Kalinkin I.P., *Practical guide of photometric methods of analysis*, 5 ed., 432 p. (Khimiya, Leningrad, 1986). (in Russ.).
11. Yakovishin L.A., Korzh E.N., Degtyar A.D., Klimenko A.V., Spectrophotometry of the supramolecular complexes of ivy and licorice triterpene glycosides with laevomycesin (chloramphenicol), *Ukr. Bioorg. Acta*, **11** (1), 33 (2013).
12. Yakovishin L.A., Grishkovets V.I., Korzh E.N., Degtyar A.D., Klimenko A.V., Supramolecular complexes of licorice and ivy triterpene glycosides with paracetamol, *Sci. Not. Taurida V.I. Vernadsky Nat. Univ. Ser. Biology, chemistry*, **26** (3), 335 (2013).
13. Yakovishin L.A., Grishkovets V.I., Klimenko A.V., Degtyar A.D., Kuchmenko O.B., Molecular complexes of ivy and licorice triterpene glycosides with doxorubicin, *Khim.-Farm. Zh.*, **48** (6), 37 (2014).
14. Babko A.K., *Physico-chemical analysis of complex compounds in the solutions*, 328 p. (Izd-vo AN USSR, Kiev, 1955). (in Russ.).

Поступила в редакцию 20.10.2014 г.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

- Баттерс Терри Д.** Институт гликобиологии Оксфордского университета, доцент факультета биохимии, заведующий лабораторией химии и биологии ингибиторов – иминосахаров
- Бесараб Олександр Борисович** Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут», асистент кафедри електричних систем та мереж
- Булыгин С.В.** ООО "Пансионат "Орбита-2", агроном
- Вовчук Ирина Леонидовна** Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова, д.б.н., профессор кафедры биохимии биологического факультета, e-mail: irvov@mail.ru
- Вяткина Оксана Валерьевна** Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, кандидат химических наук, доцент кафедры общей и физической химии, e-mail: oksana\_vyatkina@list.ru
- Галкін Олександр Юрійович** Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут», кандидат біологічних наук, доцент кафедри промислової біотехнології, e-mail: alexfbt@mail.ru
- Гидулянов Антон Александрович** Крымский агротехнологический университет, кандидат биологических наук, доцент кафедры земледелия, общей и агрономической химии, e-mail: sgaa@mail.ru
- Горщунов Юрій Володимирович** Науково-дослідний та конструкторсько-технологічний інститут міського господарства, кандидат технічних наук, старший науковий співробітник
- Гришковец Владимир Иванович** Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, доктор химических наук, профессор кафедры общей и физической химии
- Гусев Алексей Николаевич** Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, кандидат химических наук, доцент кафедры общей и физической химии, e-mail: galex0330@rambler.ru
- Дягилева Юлия Олеговна** Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, к.б.н., преподаватель кафедры общей психологии, e-mail: yulia\_dyagileva@mail.ru
- Замниус Екатерина Анатольевна** Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, аспирант кафедры общей и физической химии, e-mail: zamnius\_katerina04@rambler.ru

<b>Ибрагимова Эвелина Энверовна</b>	РВУЗ «КИПУ», к.б.н., доцент кафедры биологии, экологии и безопасности жизнедеятельности
<b>Иваненко Марина Олеговна</b>	ГУ «Институт медицинской радиологии им. С.П. Григорьева АМН Украины», младший научный сотрудник, e-mail: radimir 07@ meta.ua
<b>Кацев Андрей Моисеевич</b>	Крымский государственный медицинский университет им. С.И. Георгиевского, к.х.н., д.б.н., доцент, заведующий кафедрой общей химии, e-mail: katsev@mail.ru
<b>Кобечинская Валентина Григорьевна</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, доцент кафедры экологии и зоологии, к.б.н.
<b>Колосова Ирина Ивановна</b>	ГУ «ДМА МОЗ Украины», преподаватель кафедры медицинской биологии, фармакогнозии и ботаники
<b>Конник Олег Владимирович</b>	Севастопольский научно-производственный центр стандартизации, метрологии и сертификации, директор
<b>Корж Елена Николаевна</b>	Севастопольский национальный технический университет, кандидат химических наук, доцент кафедры физики (цикл химии)
<b>Костюк Александра Сергеевна</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, к.б.н., старший преподаватель кафедры физиологии человека и животных и биофизики, e-mail: alexkostyuk@mail.ru
<b>Котолуп М.В</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, магистр кафедры экологии и зоологии
<b>Кузьменко Елена Викторовна</b>	ГУ «Институт медицинской радиологии им. С.П. Григорьева АМН Украины», кандидат биологических наук, младший научный сотрудник
<b>Куленкова Анна Андреевна</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, аспирант кафедры физиологии человека и животных и биофизики, e-mail: anna.kulenkova@gmail.com
<b>Лившиц Игорь Владимирович</b>	ГУ «Крымский медицинский университет им. С.И.Георгиевского», доцент, кафедра акушерства, гинекологии и перинатологии факультета последипломного образования
<b>Мартынюк Виктор Семенович</b>	УНЦ «Институт биологии» Киевского национального университета имени Тараса Шевченко, д.б.н., профессор, заведующий кафедрой биофизики, заместитель директора по научной работе

<b>Меженная Наталья Александровна</b>	Пензенский государственный университет, аспирант, e-mail: natalia984@mail.ru
<b>Нурищенко Наталья Евгеньевна</b>	Институт физиологии имени академика Петра Богача УНЦ «Институт биологии» Киевского национального университета имени Тараса Шевченко, д.б.н., профессор, заведующий отделом «Биофизики», e-mail: nnurish@mail.ru
<b>Островская Светлана Сергеевна</b>	ГУ «ДМА МОЗ Украины», профессор кафедры медицинской биологии, фармакогнозии и ботаники
<b>Отурина Ирина Павловна</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, доцент кафедры ботаники и физиологии растений и биотехнологий, к.б.н.
<b>Павленко Владимир Борисович</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, д.б.н., профессор, заведующий кафедрой общей психологии
<b>Письменецкая Ирина Юрьевна</b>	Днепропетровская государственная медицинская академия, доцент кафедры биохимии, медицинской и фармацевтической химии, e-mail: pirina2004@list.ru
<b>Подпалова Ольга Николаевна</b>	Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, ассистент кафедры физиологии, e-mail: olgapodpalova@gmail.com
<b>Потоцька Світлана Олександрівна</b>	Чернігівський національний педагогічний університет імені Т.Г. Шевченка, кандидат біологічних наук, старший викладач кафедри екології та охорони природи, e-mail: sav-14@mail.ru
<b>Преснякова Елена Викторовна</b>	Медицинский институт, Пензенский государственный университет, доцент, кафедра медицинских информационных систем и технологий, кандидат биологических наук, e-mail: spl7@mail.ru
<b>Ржевская Виктория Степановна</b>	ООО "Пансионат "Орбита-2", начальник отдела биологического контроля качества
<b>Семенова Елена Федоровна</b>	Медицинский институт, Пензенский государственный университет, профессор, кафедра общей и клинической фармакологии, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, e-mail: sef1957@mail.ru
<b>Темурьянц Наталья Арменаковна</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, д.б.н., профессор кафедры физиологии человека и животных и биофизики

<b>Теплицкая Людмила Михайловна</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, доцент кафедры ботаники и физиологии растений и биотехнологий, к.б.н., e-mail: LM_teplitskaya@ukr.net
<b>Туманянц Каринэ Николаевна</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, к.б.н., с.н.с. кафедры физиологии человека и животных и биофизики, старший преподаватель кафедры медико-биологических основ физической культуры
<b>Хусаинов Денис Рашидович</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, к.б.н., доцент кафедры физиологии человека и животных и биофизики
<b>Цейслер Юлия Вадимовна</b>	Институт физиологии имени академика Петра Богача УНЦ «Институт биологии» Киевского национального университета имени Тараса Шевченко, младший научный сотрудник отдела «Биофизики»; Открытый международный университет развития человека «Украина», доцент кафедры микробиологии, современных биотехнологий и экологии, e-mail: yuliya.tseysler@gmail.com
<b>Чайка Андрей Владимирович</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, аспирант кафедры физиологии человека и животных и биофизики
<b>Черетаев Игорь Владимирович</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, к.б.н., м.н.с. кафедры физиологии человека и животных и биофизики
<b>Шаторная Вера Федоровна</b>	ГУ «ДМА МОЗ Украины», профессор, зав. кафедрой медицинской биологии, фармакогнозии и ботаники
<b>Шелюк Ольга Викторовна</b>	УНЦ «Институт биологии» Киевского национального университета имени Тараса Шевченко, доцент кафедры биофизики
<b>Шульгин Виктор Федорович</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой общей и физической химии, e-mail: shulvic@gmail.com
<b>Яковшин Леонид Александрович</b>	Севастопольский национальный технический университет, кандидат химических наук, доцент кафедры физики (цикл химии), e-mail: chemsevntu@rambler.ru

## СОДЕРЖАНИЕ

### БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

**Вовчук И.Л.**

ФАКТОРЫ РИСКА, РОЛЬ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ И ИХ РЕЦЕПТОРОВ  
В РАЗВИТИИ ГИНЕКОМАСТИИ .....3

**Галкін О.Ю., Горшунов Ю.В., Бесараб О.Б.**

БІОАНАЛІТИЧНА ВАЛІДАЦІЯ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ ДЛЯ ЯКІСНОГО  
(НАПІВКІЛЬКІСНОГО) ВИЗНАЧЕННЯ АНТИТІЛ КЛАСУ IgA ДО  
*CHLAMYDIA TRACHOMATIS*..... 14

**Гидулянов А.А.**

КРАТКОСРОЧНОЕ ВЛИЯНИЕ ДЕНАТУРИРУЮЩИХ ГИДРОФОБНЫХ АГЕНТОВ  
НА ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКУЮ ПОДВИЖНОСТЬ ГЕМОГЛОБИНА КРОВИ  
ЧЕЛОВЕКА .....26

**Ибрагимова Э.Э.**

ИССЛЕДОВАНИЕ СОВМЕСТНОГО ДЕЙСТВИЯ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ  
ПЕСТИЦИДОВ И ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА ЧАСТОТУ МУТИРОВАНИЯ КЛЕТОК  
КОРНЕВОЙ МЕРИСТЕМЫ *ALLIUM CEPA L.* .....31

**Иваненко М.О.**

ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ПРИ ИНДУЦИРОВАННОМ  
ВОСПАЛИТЕЛЬНОМ ПРОЦЕССЕ НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ .....43

**Кобечинская В.Г., Отурина И.П., Котолуп М.В.**

ДИНАМИКА ПЕРВИЧНОЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ СТЕПНЫХ  
ФИТОЦЕНОЗОВ ОПУКСКОГО ПРИРОДНОГО ЗАПОВЕДНИКА .....51

**Кузьменко Е.В.**

МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ АНЕМИИ У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ .....67

**Куленкова А.А., Дягилева Ю.О., Павленко В.Б.**

НЕЙРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РАЗВИТИЯ ЭМОЦИОНАЛЬНОЙ  
СФЕРЫ ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА .....78

**Лившиц И.В.**

ДИСКУССИОННЫЕ ВОПРОСЫ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МАТКИ У ЧЕЛОВЕКА .....88

**Островская С. С., Шаторная В.Ф., Колосова И.И.**

СОЧЕТАННОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ СВИНЦА И КАДМИЯ НА ОРГАНИЗМ (ОБЗОР  
ИНОСТРАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ) .....93

**Письменецкая И.Ю., Баттерс Т.Д.**

ВЭЖХ-СПЕКТРЫ СВОБОДНЫХ ОЛИГОСАХАРИДОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ ПРИ  
ОСТРЫХ ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ..... 102

<b>Потоцька С.О.</b> ЦЕНОТИЧНЕ ТА ФЛОРИСТИЧНЕ РІЗНОМАНІТТЯ ПРИРОДНИХ ТЕРИТОРІЙ В МЕЖАХ МІСЬКИХ ЗОН ЧЕРНІГІВСЬКОГО ПОЛІССЯ.....	112
<b>Ржевская В.С., Отурина И.П., Булыгин С.В., Теплицкая Л.М.</b> ВЛИЯНИЕ МИКРОБНОГО ПРЕПАРАТА ЭМБИКО® НА ПЛОДООБРАЗОВАНИЕ ОГУРЦОВ И БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ПОЧВЫ.....	124
<b>Семенова Е.Ф, Теплицкая Л.М, Преснякова Е.В, Меженная Н.А.</b> АНАТОМО-МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛЕПЕСТКОВ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА ROSA L .....	138
<b>Темурьянц Н.А., Костюк А.С., Туманянц К.Н.</b> ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА И ПЕРЕМЕННОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ КРАЙНЕ НИЗКОЙ ЧАСТОТЫ НА РАЗВИТИЕ ЭКРАНОИНДУЦИРОВАННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ НОЦИЦЕПЦИИ МОЛЛЮСКОВ .....	151
<b>Темурьянц Н.А., Туманянц К.Н., Костюк А.С., Хусаинов Д.Р., Черетаев И.В., Чайка А.В.</b> УЧАСТИЕ ОПИОИДНОЙ СИСТЕМЫ В ИЗМЕНЕНИИ АГРЕССИВНОГО ПОВЕДЕНИЯ КРЫС В УСЛОВИЯХ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ЭКРАНИРОВАНИЯ .....	160
<b>Цейслер Ю.В., Нурищенко Н.Е., Мартынюк В.С., Подпалова О.Н., Шелюк О.В.</b> ПОКАЗАТЕЛИ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА КРЫС В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОЙ ПРОЛОНГИРОВАННОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИИ .....	169

## **ХИМИЧЕСКИЕ НАУКИ**

<b>Вяткина О.В.</b> ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЕРОКСИДАЗЫ РЕДЬКИ ЧЕРНОЙ В ТЕСТ-СИСТЕМАХ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЕНОЛОВ .....	178
<b>Кацев А.М.</b> ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ СВЕТЯЩИХСЯ БАКТЕРИЙ ЧЕРНОГО И АЗОВСКОГО МОРЕЙ И ИХ АНТИОКСИДАНТНАЯ ЗАЩИТА .....	184
<b>Конник О.В., Замниус Е.А., Гусев А.Н., Шульгин В.Ф.</b> СПЕЙСЕРИРОВАННЫЕ КООРДИНАЦИОННЫЕ СОЕДИНЕНИЯ МЕДИ(II) НА ОСНОВЕ САЛИЦИЛИДЕНГИДРАЗОНОВ ИМИНОДИУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ... ..	194
<b>Яковишин Л.А., Гришковец В.И., Корж Е.Н.</b> СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ТРИТЕРПЕНОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ ПЛЮЩА И СОЛОДКИ СО СТРЕПТОЦИДОМ.....	204
<b>СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ .....</b>	211
<b>СОДЕРЖАНИЕ .....</b>	215