

Журнал основан в 1918 г.

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

Научный журнал

*Серия “Биология, химия”*

**Том 27 (66). № 4**

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), №4, 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. № 4. С. 3-11.

УДК 575.174.015.3

## К ВОПРОСУ О ГЕНЕТИЧЕСКОМ ПОЛИМОРФИЗМЕ ВИДОВ-ДВОЙНИКОВ МАЛЯРИЙНЫХ КОМАРОВ КОМПЛЕКСА *ANOPHELES MACULIPENNIS* В КРЫМУ

*Артова М.А., Разумейко В.Н., Симчук А.П.*

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

Рассмотрены методы определения генетического полиморфизма малярийных комаров комплекса *Anopheles maculipennis*. Осуществлён подбор случайных ДНК маркеров методом RAPD-PCR. Проведена идентификация видов-двойников комплекса *An. maculipennis* методом PCR-RFLP с применением второго внутреннего транскрибируемого спейсера кластера рибосомных генов ITS2. Проведена эндонуклеазная рестрикция ПЦР продукта *CfoI* (*HhaI*).

**Ключевые слова:** генетический полиморфизм, ДНК маркеры, PCR-RFLP, внутренний транскрибируемый спейсер (ITS2), эндонуклеаза *CfoI*, *Anopheles maculipennis*.

### ВВЕДЕНИЕ

Общеизвестно, что малярийные комары являются переносчиками возбудителей арбовирусных инфекций, в том числе и малярийного плазмодия. По данным Глобального Фонда по борьбе со СПИД, малярией и туберкулёзом, ежегодно от малярии погибают около 2,6 миллиона человек, из которых 75 % – дети в возрасте менее 5-ти лет. В Крыму отмечено 6 видов малярийных комаров, 3 из которых принадлежат комплексу *Anopheles maculipennis* (Meigen, 1818), включающему виды-двойники *A. m. maculipennis* Meigen, *A. m. atroparvus* van Thiel и *A. m. messeae* Falleroni [1]. Их распределение на полуострове неравномерное, что объясняется приуроченностью их к определенным территориям.

Морфологическая идентификация видов комплекса *A. maculipennis* проводится по окраске экзохориона яйца и морфологии яиц, что приводит к ряду неточностей при промежуточных вариантах окраски и схожести морфологии яиц (*A. maculipennis*, *A. atroparvus*). Цитогенетические методы также не всегда применимы для идентификации, например, у гомосеквентных видов невозможно проанализировать видовую структуру политенных хромосом. Методы молекулярно-генетической идентификации в исследованиях видов-двойников комплексов рода *Anopheles* последнее время всё более популярны, так как они позволяют надёжно и

быстро устанавливать видовую принадлежность [2-3]. На территории Крыма молекулярно-генетические исследования видовой принадлежности малярийных комаров ранее не проводились.

Цель работы – анализ популяционно-видовой генетической дифференциации видов-двойников комплекса *Anopheles maculipennis* на территории Крыма методами RAPD-PCR и PCR-RFLP анализа с подбором оптимальных ДНК маркеров и идентификацией видов-двойников комплекса *A. maculipennis*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для молекулярно-генетических исследований послужили личинки III-IV стадии развития комаров комплекса *A. maculipennis*, отловленные в анофелогенных водоемах Крыма в 2014 г в посёлках Курганное, Ишунь, Мирное, Калиновка, Красногорка и Останино Крымского полуострова.

Используемые методы анализа: метод RAPD-PCR (случайная амплификация полиморфной ДНК, Random Amplification of Polymorphic DNA) и метод PCR-RFLP (полиморфизм длин рестриционных фрагментов, Restriction Fragment Length Polymorphism). RAPD-PCR проводили в реакционной смеси (25 мкл) на термоциклере «Терцик» (ДНК-Технология, Россия) с использованием реактивов для полимеразной цепной реакции GenePak™ PCR Universal (ИзоГен, Москва) с праймерами, комплементарными 3'-концу гена 5,8S рРНК и 5'-концу гена 28S рРНК и фланкирующими область второго внутреннего транскрибируемого спейсера кластера рибосомных генов для комаров комплекса *A. maculipennis*. Амплификацию проводили в режиме: 1 цикл денатурации 98 °С в течение 3 мин и последующие 35 циклов по схеме: денатурация – 95 °С (20 сек), отжиг – 36 °С (20 сек), полимеризация – 72 °С (40 сек). Терминальную стадию синтеза проводили при 72 °С – 7 мин. Отжиг для праймеров 5,8S и 28S проводили при  $t = 500$  °С.

Видовую идентификацию комаров комплекса *A. maculipennis* проводили методом PCR-RFLP на основании различий в паттернах рестрикции. Полученные ПЦР-продукты обрабатывали эндонуклеазой рестрикции *CfoI* (*HhaI*) (Promega Corporation, USA). Для этого 10 мкл ПЦР продукта смешивали с 2мкл 10х буферного раствора для рестриктазы *CfoI* и 10 ед рестриктазы. Смесь инкубировали при 37 °С в течение 5-7 мин, затем производили визуализацию результатов методом горизонтального электрофореза в 2,5 % агарозном геле (1,8 %) с использованием трис-борат-ЭДТА буфера.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Подбор случайных молекулярно-генетических (ДНК) маркеров

На первом этапе исследования для выявления методом RAPD-PCR генетического полиморфизма видов-двойников как основы для сравнительного генетического анализа произвели подбор случайных ДНК-маркеров, представляющих уникальную последовательность ДНК. Были использованы образцы ДНК, выделенные из 10 личинок вида *A. maculipennis*.

В итоге из 30-ти праймеров (длиной 10 пар нуклеотидов) случайным методом было отобрано 9, из которых выбрали праймеры с 3 и более четкими ампликонами (дисками)

на электрофореграмме. Из 6 праймеров с видимыми ампликонами отобраны два: № 38 (CCGCCCACTG), № 42 (GGGATATCGC). Для идентификации размеров ампликонов использовали DNA-markers M 100 (ИзоГен, Москва) с длиной фрагментов 100-1000 пар нуклеотидов.

При использовании праймера № 38 получено 17 продуктов амплификации (дисков) (Табл. 1.). Диск f (размер 0.6 тысяч пар нуклеотидов – тыс.п.н), диск n (размер 0.15 тыс. п.н.) и диск l (размер 0.3 тыс. п.н.) отмечены у 60 % отобранных личинок комаров, диск k (размер 0.35 тыс. п.н.) отмечен у 80 % экземпляров. Остальные фрагменты отмечены у половины и меньше экземпляров *A. maculipennis*. Соответственно, фрагменты f, n, l и k праймера № 38 были признаны наиболее перспективными для выявления генетического полиморфизма *A. maculipennis*.

**Таблица 1**

**RAPD-фрагменты, полученные в результате исследования праймеров № 38 и № 42 на образцах ДНК из 10 личинок вида *A. maculipennis***

Ампликоны	Длина праймера № 38 (тыс. пар нукл.)	Встречаемость праймера № 38 (%)	Длина праймера № 42 (тыс. пар нукл.)	Встречаемость праймера № 42 (%)
p	0.10	50	<b>0.15</b>	<b>70</b>
o	0.13	30	0.20	50
n	<b>0.15</b>	<b>60</b>	0.22	40
m	0.22	50	0.25	30
l	<b>0.30</b>	<b>60</b>	<b>0.30</b>	<b>60</b>
k	<b>0.35</b>	<b>80</b>	0.33	20
j	0.40	40	<b>0.35</b>	<b>70</b>
i	0.45	50	<b>0.40</b>	<b>100</b>
h	0.50	50	0.45	40
g	0.52	40	<b>0.50</b>	<b>80</b>
f	<b>0.60</b>	<b>60</b>	0.55	50
e	0.67	20	<b>0.60</b>	<b>60</b>
d	0.70	20	0.75	20
c	0.80	20	0.80	20
b	0.90	30	<b>0.90</b>	<b>80</b>
a	0.95	30	<b>1,00</b>	<b>70</b>

При использовании праймера № 42 получено также 17 дисков (Табл. 1.). У 60 % отобранных личинок комаров на электрофореграмме зарегистрированы диск e (размер 0.6 тыс. п.н.) и диск l (размер 0.3 тыс. п.н.). Диск a (размер 1.0 тыс. п.н.), диск j (размер 0.35 тыс. п.н.) и диск p (размер 0.15 тыс. п.н.) отмечены у 70 % личинок, диск b (размер 0.9 тыс. п.н.) и диск g (размер 0.5 тыс. п.н.) зарегистрированы у 80 % личинок *A. maculipennis*. Диск i (размер 0.4 тыс. п.н.) обнаружен у всех отобранных личинок малярийных комаров. Соответственно, диск i может быть наиболее перспективным для изучения генетического полиморфизма при использовании праймера № 42. Наряду с

ним, в индикации полиморфизма возможно использовать фрагменты e, l, a, j, p, b и g.

На основе литературных источников были отобраны 3 ДНК-маркера, наиболее точно отражающие полиморфизм малярийных комаров комплексов *A. gambiae* и *A. arabiensis* [4]. Было решено использовать данные маркеры для изучения полиморфизма малярийных комаров комплекса *A. maculipennis* в Крыму. Последовательность праймера № 1 – 5'-CTGCTGGGAC-3', праймера № 2 – 5'-GAAACGGGTG-3', праймера № 3 – 5'-TCACGATGCA -3'.

Таблица 2

Ампликоны (диски на электрофореграмме), выделенные из праймеров № 1-3

Ампликоны праймера № 1	Длина (пар нукл.)	Ампликоны праймера № 2	Длина (пар нукл.)	Ампликоны праймера № 3	Длина (пар нукл.)
a	600	a	650	a	720
b	450	b	580	b	610
c	350	c	430	c	500
d	300	d	400	d	370
e	220	e	320	e	250
f	180	f	280	f	200
		e	210		
		h	150		

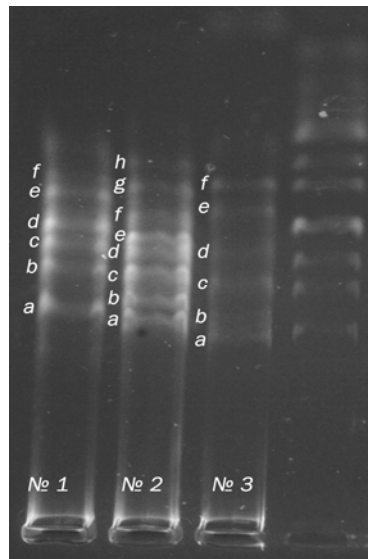


Рис. 1. Разделение дисков на электрофореграмме, полученные при изучении праймеров № 1, № 2, № 3.

При исследовании праймеров № 1, № 2 и № 3 было получено от 6 до 8 видимых ампликонов (Табл. 2.; Рис. 1.), с помощью которых возможно выявление внутривидовых и межпопуляционных различий комаров комплекса *A. maculipennis*.

**Видовая идентификация малярийных комаров комплекса *A. maculipennis* с использованием маркера области ITS2.**

При использовании молекулярно-генетического подхода для идентификации спорных видов и видов-двойников комплексов малярийных комаров маркерами могут служить внутренние транскрибируемые спейсеры ITS, разделяющие тандемно повторенные 18S-, 5.8S-, 28S- подобные гены в кластере рибосомной ДНК. Был разработан молекулярный ключ с использованием первичной структуры области второго внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS2) для идентификации видов комплекса *A. maculipennis*, обитающих в России и сопредельных территориях [5]. Для более точной видовой идентификации малярийных комаров комплекса использовали метод ПЦР с изучением полиморфизма длин рестрикционных фрагментов генома.

Для проведения видовой диагностики были выделены образцы ДНК с 30 личинок малярийных комаров комплекса *A. maculipennis*, отловленных в различных водоемах центральной и северной части степного Крыма.

Были использованы праймер 5,8S с последовательностью 5'-TGT GAA CTG CAG GAC ACA TG-3' и праймер 28S с последовательностью 5'- ATG CTT AAA TTT AGG GGG TA-3'. Указанные праймеры в процессе амплификации способны ограничивать (фланкировать) область второго внутреннего транскрибируемого спейсера кластера рибосомных генов ITS2 и тем самым являются ДНК маркерами, способными идентифицировать принадлежность видов-двойников к комплексу.

Была проведена ПЦР с праймерами, комплементарными 3'-концу гена 5,8S рРНК и 5'-концу гена 28S рРНК и фланкирующими область второго внутреннего транскрибируемого спейсера кластера рибосомных генов. Для амплификации данной области генома комаров комплекса *A. maculipennis* были использованы праймеры 5,8S и 28S. Для определения принадлежности комаров к комплексу *A. maculipennis* проанализировали размер второго внутреннего транскрибируемого спейсера кластера рибосомных генов (ITS2). Размер продукта амплификации, полученного в результате ПЦР с праймерами 5,8S и 28S, составляет около 450 п.н. (Рис. 2.).

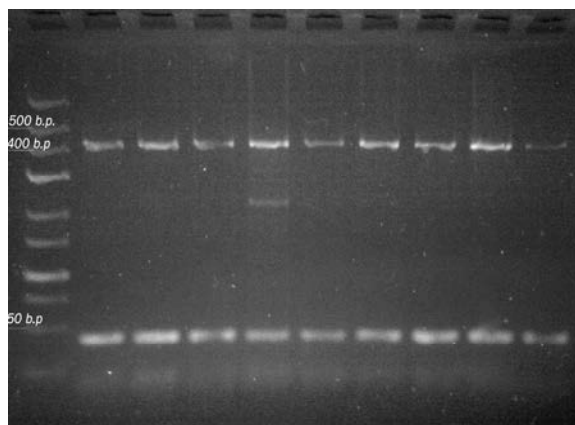


Рис. 2. Электрофоретическое фракционирование транскрибируемого спейсера ITS2 ПЦР-продуктов.

Полученные данные подтверждают гипотезу [3] о подобии молекулярного ключа для идентификации видов комплекса *A. maculipennis* по наличию специфичного ампликона с размером около 450 п.н. в средней полосе России и соседних географических регионах, коим и является Крымский полуостров. Ампликоны размером около 50 п.н не стоит считать специфическими для данного комплекса, и вполне вероятно, что их появление связано с условиями проведения амплификации. Таким образом, доказана возможность использования специфических ДНК-маркеров 5,8S и 28S с анализом размера транскрибируемого спейсера ITS2 для эффективной идентификации принадлежности к комплексу *A. maculipennis*.

**Видовая идентификация комаров комплекса *A. maculipennis* методом PCR-RFLP на основании различий длин рестрикционных фрагментов**

Идентификация видов комплекса *A. maculipennis* (*A. atroparvus*, *A. maculipennis*, *A. messeae*) непосредственно после реакции амплификации с праймерами 5,8S и 28S затруднена из-за сходства размеров ПЦР-продуктов. Поэтому идентификацию видов осуществляли во время проведения рестрикции ПЦР продукта с использованием эндонуклеазы *CfoI* (*HhaI*). Анализ полученных фрагментов рестрикции с использованием литературных данных [5] позволяют достаточно четко идентифицировать вышеуказанные виды (Рис. 3.)

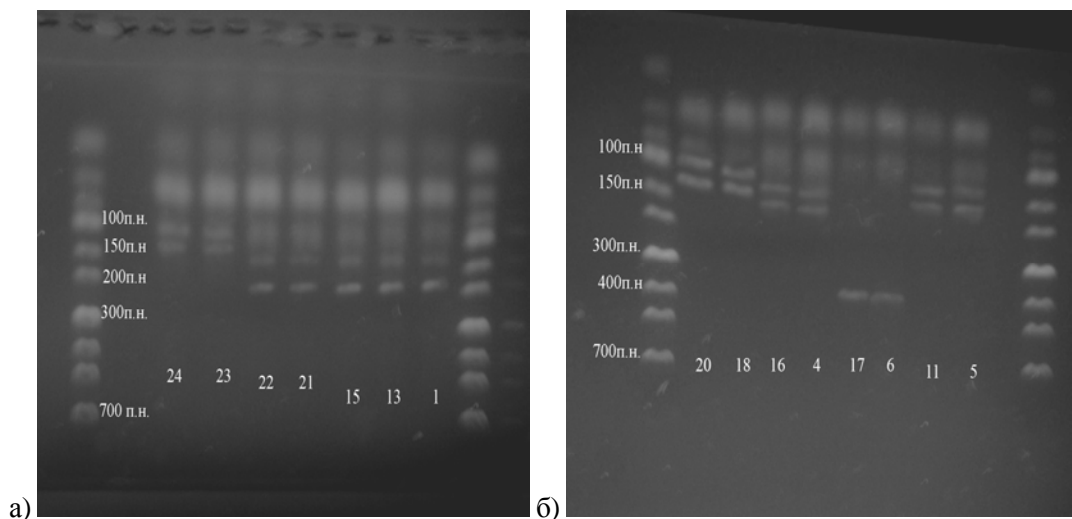


Рис. 3. Электрофоретическое фракционирование ПЦР-фрагментов рестрикции: а) 1, 13, 15 – *A. maculipennis*; б) 6, 17 – *A. atroparvus*; а-б) 23, 24, 5, 11, 4, 16, 18, 20 – *A. messeae*.

Общеизвестно, что мутационную изменчивость сайтов рестрикции можно легко зафиксировать по определению разности длины рестрикционных фрагментов ДНК во время гибридизации со специфическими ДНК-зондами. Результаты замера размеров фрагментов рестрикции эндонуклеазы *CfoI* у личинок комплекса *A. maculipennis* представлены в таблице 3.



Таблица 3.

Размер фрагментов рестрикции ДНК

Вид	Длина фрагментов рестрикции (п.н.)					
	100	120	140	150	200	390
<i>A. maculipennis</i>	+		+		+	
<i>A. atroparvus</i>						+
<i>A. messeae</i>		+		+		

Размеры рестрикционных фрагментов по методу PCR-RFLP помогли установить видовой состав малярийных комаров в полевых сборах. В водных биотопах Керченского полуострова обнаружены все три вида комплекса *A. maculipennis*, указанные ранее нами в литературных источниках [1]. Личинки малярийного комара *A. maculipennis* отмечены на полузатопленных болотистых участках Останинских плавней, богатых водной растительностью, в районе Самарлинского водохранилища. Вблизи посёлка Калиновка во временных водотоках обнаружены личинки *A. messeae*. Данные виды приурочены к пресноводным водоёмам, где создают множественные биотопы. Для малярийного комара *A. atroparvus* характерно заселение водоёмов с небольшой степенью минерализации, что также подтверждено находками личинок этого вида в солоноватых водотоках со слабым течением вблизи села Красная горка.

Наиболее массовый в Крыму малярийный комар *A. maculipennis* также был найден в водоёмах предгорной части Крыма. В частности, отбор материала для ДНК-анализа произвели в водоёмах близ посёлка Мирное, Симферопольский район.

Результаты генетических исследований свидетельствуют о наличии в степной части Крымского полуострова биотопов выхлода малярийного комара *A. messeae*. В частности, ДНК-идентификация комаров показала наличие этого вида в Раздольненском и Джанкойском районах. Личинки *A. messeae* отмечены в рисовых чеках вблизи села Курганное, на участках сбросного канала вблизи села Ишунь и в рукаве Северо-Крымского канала недалеко от г. Джанкой. Отмечено также снижение количества водных участков, заселяемых комарами в связи со снижением объёмов орошения и уменьшением количества воды в степном Крыму.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. При анализе генетического полиморфизма малярийных комаров комплекса *A. maculipennis* были подобраны и изучены случайные ДНК-маркеры длиной 10 пар нуклеотидов. Наиболее оптимальными из них являются праймеры № 1, № 2 и № 3 с 6-8 ампликонами. Для генетических исследований комплекса *A. maculipennis* был использован праймер № 42 с 17 ампликонами, 8 из которых отмечены более чем у 50% изученных особей.
2. Анализ размеров второго внутреннего транскрибируемого спейсера кластера рибосомных генов (ITS2) с помощью специфических праймеров 5,8S и 28S показал возможность определения с его помощью видовой принадлежности к комплексу *A. maculipennis*. Для точного ДНК-анализа был получен продукт амплификации

длиной 450 п.н., что подтверждает генетическое сходство фауны малярийных комаров Крыма и средней полосы России.

3. Применение метода PCR-RFLP с помощью рестрикции ПЦР продукта с использованием эндонуклеазы *CfoI* (*HhaI*) для идентификации видов двойников комплекса *Anopheles maculipennis* позволило определить распределение видов по территории Крыма. На Керченском полуострове были зарегистрированы все три вида комплекса *A. maculipennis*, к степной части Крыма приурочен *A. messeae*, к предгорной зоне Крыма – *A. maculipennis*. Условия вылода данных видов определяют специфические ландшафты и разнообразие характерных водоёмов в каждой зоне.

**Благодарности.** Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта по конкурсу p\_юг\_a № 14-44-01607.

#### Список литературы

1. Разумейко В. Н. Особенности распределения кровососущих комаров комплекса *Anopheles* в бассейне реки Салгир / В.Н. Разумейко, А.В. Ивашов // Экосистемы, их оптимизация и охрана (темат. сб. науч. тр.). – 2011. – Вып. 4. (23). – С. 78–83.
2. Гордеев М. И. Молекулярно-генетический анализ малярийных комаров комплекса *Anopheles maculipennis* (Diptera, Culicidae) Азербайджана / М.И. Гордеев, О.В. Безжонова, И.И. Горячева [и др.] // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2010. – Вып. 4. – С. 43–45.
3. Кешишьян А. Генетический анализ малярийных комаров комплекса *Anopheles maculipennis* (Diptera, Culicidae) Армении / А. Кешишьян, М.И. Гордеев, О.В. Безжонова [и др.] // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2009. – Вып. 3. – С. 24–28.
4. Wilkerson R.C. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers readily distinguish cryptic mosquito species (Diptera: Culicidae: *Anopheles*) / R.C. Wilkerson, T.J. Parsons, D.G. Albright, T.A. Klein, M.J. Braun // *Insect Molecular Biology* (1993). – 1(4). – P. 205-211.
5. Безжонова О.В. Комплексы видов кровососущих комаров рода *Anopheles* (Diptera, Culicidae) России и ближнего зарубежья / О.В. Безжонова // Автореф. дис. канд. биол. наук. – М.: МГУ им. Ломоносова, 2011. – 24 с.

#### ON THE PROBLEM OF THE GENETIC POLYMORPHISM OF SIBLING SPECIES OF MALARIA MOSQUITO *ANOPHELES MACULIPENNIS* COMPLEX IN CRIMEA

*Artova M. A., Razumeiko V. N., Simchuk A. P.*

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

The analysis of population-specific genetic differentiation of sibling species from the *Anopheles maculipennis* complex in Crimea was carried out using RAPD-PCR and PCR-RFLP methods. Nine primers were used and two of them were selected due to the most distinct amplification (electrophoregram disks): #38 (CCGCCCACTG) and #42 (GGGATATCGC). DNA-markers M 100 (IzoGen, Moscow) with lengths of 100-1000 bp were used to identify the size of the amplicons. Thirty four DNA fragments were totally

obtained using the primers selected. Fragments f, n, l and k (primer #38) and fragment i (primer #42) were the most promising for the detection of genetic polymorphisms in *A. maculipennis*. Next tree primers were selected in accordance to World-wide literature. They are: #1 – 5'-CTGCTGGGAC-3', #2 - 5'-GAAACGGGTG-3', #3 - 5'-TCACGATGCA -3'. Their application to the *A. maculipennis* complex allowed obtaining 6-8 visible amplicons.

Species identification of sibling species from the *A. maculipennis* complex was also carried out using molecular key based on the primary structure of the area of the second internal transcribed spacer (ITS2). For more accurate species identification of *Anopheles* mosquitoes we used PCR with the study of restriction fragment length polymorphism of the genome. There were used primers 5,8S (5'-TGT GAA CTG CAG GAC ACA TG-3') and 28S (5'- ATG CTT AAA TTT AGG GGG TA-3'). These DNA markers when amplifying can flank region ITS2, which is important for the identification of sibling species belonging to the complex. PCR was carried out with primers complementary to the 3'-end of the 5,8S rRNA gene and to the 5' end of the 28S rRNA gene and there was defined the size of flanking regions of ITS2 ribosomal gene cluster. The size of the amplification product obtained by PCR with primers 5,8S and 28S was approximately 450 bp.

Identification of species from the *A. maculipennis* complex (*A. atroparvus*, *A. maculipennis*, *A. messeae*) is difficult directly after the amplification reaction with the primers and 28S 5,8S due to close sizes of the PCR products. Nonetheless PCR-RFLP method helped to establish the species composition of *Anopheles* mosquitoes in field collections. *A. maculipennis* and *A. messeae* larvae confined to freshwater ponds in the Kerch Peninsula, *A. atroparvus* larvae inhabit salted water bodies. The results of genetic studies suggest the presence of the *A. messeae* breeding mosquitoes in the steppe part of Crimea habitat. It was also noted reduction of water areas populated by mosquitoes due to lower volumes of irrigation and reducing the amount of water in the steppe Crimea.

**Keywords:** genetic polymorphism, DNA markers, PCR-RFLP, the internal transcribed spacer (ITS2), endonuclease *CfoI*, *Anopheles maculipennis*.

#### References

1. Razumeiko V.N., Ivashov A.V. Features of distribution of mosquitoes *Anopheles* complex river basin Salgir, *Ecosystems, their optimization and security*, **4** (23), 78-83 (2011).
2. Gordeev M.I., Bezzhonova O.V., Goryachev I. et al. Molecular genetic analysis of complex malaria mosquito *Anopheles maculipennis* (Diptera, Culicidae) Azerbaijan *Medical Parasitology and parasitic diseases*. **4**, 43-45 (2010).
3. Keshishyan A.A., Gordeev M.I., Bezzhonova O.V. et al. Genetic analysis of complex malaria mosquito *Anopheles maculipennis* (Diptera, Culicidae) RA, *Medical Parasitology and Parasitic Diseases*, **3**, 24-28 (2009).
4. Wilkerson R.C., Parsons T.J., Albright D.G., Klein T.A. and Braun M.J. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers readily distinguish cryptic mosquito species (Diptera: Culicidae: *Anopheles*), *Insect Molecular Biology*, **1** (4), 205-211 (1993).
5. Bezzhonova O.V. Complex of species of mosquitoes genus *Anopheles* (Diptera, Culicidae) in Russia and CIS, *thesis of the candidate of biological sciences*, MSU University, 24 p (2011).

Поступила в редакцию 28.10.2014 г.

**УДК 577.112:612**

## **ИЗМЕНЕНИЯ ВНУТРИЭРИТРОЦИТАРНОГО ЛИПИДНОГО СОСТАВА ПРИ ЭРИТРЕМИИ И АПЛАСТИЧЕСКОЙ АНЕМИИ**

*Елкина Н.М., Коношенко С.В.*

*Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Россия  
E-mail: yolkina@com.ua*

Установлено, что в эритроцитах больных эритремией и апластической анемией снижается содержание общих липидов, а также содержание отдельных липидных фракций. Наиболее выраженные изменения показаны для фракции фосфолипидов и фракции свободных жирных кислот.

В содержании липидных фракций эритроцитов прослеживаются различия, обусловленные видом патологии.

**Ключевые слова:** эритроциты, липидные фракции, окислительный стресс, эритремия, апластическая анемия.

### **ВВЕДЕНИЕ**

Изучение биохимических изменений в организме человека при различных заболеваниях и патологических состояниях является одной из задач современной медицины и биологии [1-3]. К числу заболеваний, недостаточно изученных в этом аспекте, относятся эритремия и апластическая анемия – гематологические заболевания онкологического характера.

Ранее [4] нами было показано, что при эритремии и апластической анемии в эритроцитах интенсифицируются реакции пероксидации липидов и окислительной модификации протеинов, что свидетельствует о развитии окислительного стресса, связанного с генерированием активных форм кислорода (АФК). Поскольку липиды являются одной из мишеней действия АФК, представляло интерес изучить липидный состав эритроцитов у больных эритремией и апластической анемией, что и составило цель настоящей работы.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Материалом для исследований служили эритроциты практически здоровых людей (контрольная группа, 20 человек, средний возраст 39,0 лет) и двух групп больных. Первая группа – больные эритремией I степени (9 человек, средний возраст 55,0 лет); вторая группа – больные апластической анемией (9 человек, средний возраст 50,0 лет).

Кровь практически здоровых людей брали на станции переливания крови г. Симферополя, кровь больных – на базе Крымского онкологического центра (г. Симферополь). Кровь брали при поступлении в стационар, перед началом лечения.

Эритроциты гемолизировали по методу [5] без добавления толуола. Липидные экстракты гемолизатов эритроцитов получали, используя метод Фолча [6]. Содержание общих липидов определяли колориметрическим методом с фосфорнованилиновым реактивом [6]. Фракционный состав липидов изучали методом тонкослойной хроматографии на пластинах с силикагелем фирмы «Мерк» [6, 7]. Использовали систему растворителей, которая содержала гексан, диэтиловый эфир и ледяную уксусную кислоту (73:25:2).

Пластины обрабатывали 10% раствором фосфорномолибденовой кислоты, выдерживая при 80-100<sup>0</sup>С до появления синих пятен. Идентификацию липидных фракций проводили с учетом подвижности стандартов, а также данных литературы [7].

Содержание фракций липидов выражали в мг/мл. Полученные данные обрабатывали статистически, используя t-критерий Стьюдента.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследований показали, что в липидном экстракте гемолизатов эритроцитов здоровых людей и больных эритремией и апластической анемией идентифицируются фосфолипиды, холестерол, моноглицериды, диглицериды, свободные жирные кислоты и стериды.

По сравнению с контрольной группой в гемолизатах эритроцитов больных эритремией наблюдаются достоверные изменения количественного содержания практически всех фракций липидов (табл. 1). Отмечено снижение содержания фосфолипидов (в 6,2 раза), холестерола (в 4,6 раза), моноглицеридов (в 3,6 раза), диглицеридов (в 2,2 раза), свободных жирных кислот (в 21,7 раза) и стеридов (в 5,6 раза). Наиболее выраженные изменения прослеживаются в содержании свободных жирных кислот и фосфолипидов. При этом содержание общих липидов в гемолизатах эритроцитов больных эритремией было в 6,1 раза меньше по сравнению с контрольной группой доноров (0,83±0,01 мг/мл против 5,03±0,19 мг/мл у доноров).

Таблица 1

#### Липидный состав гемолизатов эритроцитов больных эритремией (M ± m)

Фракции липидов	Содержание липидных фракций, мг/мл	
	Контрольная группа	Больные эритремией
Фосфолипиды	0,81 ± 0,02	0,13 ± 0,005*
Холестерол	0,65 ± 0,01	0,14 ± 0,008*
Моноглицериды	0,57 ± 0,01	0,16 ± 0,008*
Диглицериды	0,24 ± 0,008	0,11 ± 0,005*
Свободные жирные кислоты	1,3 ± 0,03	0,06 ± 0,005*
Стериды	0,73 ± 0,02	0,13 ± 0,004*

\* – достоверность различия по сравнению с контрольной группой (p < 0,05).

Аналогичные изменения прослеживаются в липидном спектре гемолизатов эритроцитов больных апластической анемией (табл. 2). По сравнению с контрольной группой у больных апластической анемией наблюдается достоверно меньшее содержание фосфолипидов (в 3,2 раза), диглицеридов (в 2,0 раза), свободных жирных кислот (в 10,8 раза) и стеридов (в 2,4 раза). Содержание общих липидов в гемолизатах эритроцитов больных апластической анемией было также значительно ниже: в 4,0 раза по сравнению с контрольной группой.

Таблица 2

**Липидный спектр гемолизатов эритроцитов больных апластической анемией (M ± m)**

Фракции липидов	Содержание липидных фракций, мг/мл	
	Контрольная группа	Больные эритремией
Фосфолипиды	0,81 ± 0,02	0,18 ± 0,008*
Холестерол	0,65 ± 0,01	0,21 ± 0,008*
Моноглицериды	0,57 ± 0,01	0,18 ± 0,009*
Диглицериды	0,24 ± 0,008	0,12 ± 0,006*
Свободные жирные кислоты	1,3 ± 0,03	0,12 ± 0,006*
Стериды	0,73 ± 0,02	0,30 ± 0,01*

\* – достоверность различия по сравнению с контрольной группой (p < 0,05).

Как и у больных эритремией, в эритроцитах больных апластической анемией наблюдаются более выраженные изменения в содержании свободных жирных кислот и фосфолипидов.

Однако, несмотря на общую в целом направленность изменений в содержании липидных фракций, следует отметить некоторые особенности липидного спектра гемолизатов эритроцитов больных, обусловленные видом патологии. Так, в эритроцитах больных эритремией, изменения в содержании фосфолипидов, холестерина, стеридов и свободных жирных кислот были более значительными по сравнению с эритроцитами больных апластической анемией. Особенно выраженными оказались различия в содержании свободных жирных кислот: у больных эритремией количественное содержание этой фракции было в 2,0 раза ниже, чем у больных апластической анемией.

Как известно из литературы [8], основной мишенью для АФК в реакциях пероксидации липидов являются полиненасыщенные жирные кислоты, высоким содержанием которых отличаются фосфолипиды, в частности, лецитины. Утратив остаток жирной кислоты в β-положении в результате разрушительного действия

АФК, лецитины превращаются в лизолецитины, характеризующиеся способностью проявлять гемолитический эффект [9].

Из этого следует, что усиление перекисидации липидов в эритроцитах при эритремии и апластической анемии может быть фактором, создающим условия для повреждения эритроцитарной мембраны, нарушения ее целостности и структурно-функционального состояния.

Вместе с этим, деструктивные процессы, осуществляемые под действием АФК и связанные с распадом липидных компонентов в цитозоле эритроцитов, ведут к снижению уровня резервных липидов, которые могли бы использоваться для репарации поврежденных участков эритроцитарной мембраны.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на основании результатов исследований можно сделать следующие выводы:

1. При эритремии и апластической анемии в эритроцитах снижается содержание общих липидов, а также содержание отдельных липидных фракций. Наиболее выраженные изменения показаны для фракции фосфолипидов и фракции свободных жирных кислот.
2. Несмотря на общую, в целом, направленность изменений в содержании липидных фракций эритроцитов двух групп больных, наблюдаются различия, обусловленные видом патологии.
3. При эритремии изменения в содержании отдельных липидных фракций в эритроцитах являются более выраженными, чем при апластической анемии.

### Список литературы

1. Меньшиков Е.Б. Окислительный стресс при воспалении / Е.Б. Меньшиков, Н.К. Зенков // Усп. совр. биол. – 1997. – Т. 117, № 2. – С. 155-169.
2. Владимиров Ю.А. Активные формы кислорода и азота: значение для диагностики, профилактики и терапии / Ю.А. Владимиров // Биохимия. – 2004. – Т. 69, вып. 1. – С. 5-7.
3. Kaur K. Lipid peroxidation and the level of antioxidant enzymes in coronary artery disease / K. Kaur // Indian J. of Clin. Biochem. – 2008. – V. 23, № 1. – P. 33-37.
4. Ёлкина Н.М. Процессы перекисидации липидов, метгемоглобинообразования и генерирования активных форм кислорода в эритроцитах больных эритремией / Н.М. Ёлкина // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. – Серия: «Биология, химия». – Т. 26 (65), № 4. – С. 39-45.
5. Drabkin D. A simplified technique for large scale crystallization myoglobin and haemoglobin in the crystalline / D. Drabkin // Arch. Biochem. – 1949. – V. 21. – P. 224-226.
6. Биохимические методы исследования в клинике / Под ред. А.А. Покровского. – М.: Медицина, 1969. – С. 28-30.
7. Филиппович Ю.Б. Практикум по общем биохимии / Ю.Б. Филиппович, Т.А. Егорова, Г.А. Севастьянова. – М.: Просвещение, 1975. – 259 с.
8. Владимиров Ю.А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю.А. Владимиров, А.И. Арчаков. – М.: Наука, 1972. – 252 с.
9. Биологические мембраны / Под ред. П.В. Сергеева. – М.: Медицина, 1973. – 248 с.

## CHANGES OF INTRAERYTHROCYTES LIPIDS CONTENT UNDER ERYTHRAEMIA AND APLASTIC ANEMIA

*Yolkina N., Konoshenko S.*

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

Elucidation of the molecular basis of various diseases and pathological states of human organism is one of the most significant problems of medicine and biology [1, 2].

It is known, that much diseases are connected with development of oxidative stress when the production of oxygen active forms (AFO) is intensified [3].

Lipids are one of the main targets for AFO [3]. In this connection, the studying of lipid content in the cells of different type under diseases with oxidative stress may has importance for understanding of molecular bases of different diseases, in particular, of hematological illnesses.

Given that under some diseases erythrocytes are involved in pathological process [4, 5] the aim of the present work was to study the content different lipids fractions in erythrocytes of patients with erythraemia and aplastic anemia.

The materials for the study were the erythrocytes of healthy subjects (control group) and patients with erythraemia I degree (9 patients at the age from 50,0 to 60,0 years) and with aplastic anemia (9 patients at the age from 45,0 to 55,0 years). The blood was taken in Simferopol Oncological Centre before treatment for an illness.

The erythrocytes were hemolysated by distilled water. In hemolysates of erythrocytes the contents of total lipids and some lipids fractions were determined.

Lipids of hemolysates were fractionated by method of thin-layer chromatography on plates with silicagel of "Merk" [6].

It has been shown that in erythrocytes of patients with erythraemia and aplastic anemia the content of total lipids was lowered (506% and 337% less as compared with control group, for patients of first and second groups, accordingly). At the same time the content of different lipids fractions is lowered also (phospholipids, cholesterol, monoacylglycerols, diacylglycerols, free fatty acids and steroids). The changes of the content of phospholipids and free fatty acids were more considerable. It is known [7] that the main target for action of oxygen active forms in the cells are polyunsaturated fatty acids (PUFA). The distruction of PUFA and other fatty acids in erythrocytes may be one of the cause of lowering of the level of reserve lipids which are utilised for reparation of erythrocyte membrane.

It must be noted that the changes of the content of lipids fractions in erythrocytes of patients with erythraemia were more considerable as compared with aplastic anemia.

Thus, under erythraemia and aplastic anemia the lowering of the content of different lipids fractions in erythrocytes is observed. These changes of lipids content in erythrocytes under erythraemia and aplastic anemia have connect with type of pathology.

**Keywords:** erythrocytes, lipids fractions, oxidative stress, erythraemia, aplastic anemia.



**References**

1. Dubinina E.E., Pustigina A.V., Oxidative modification of proteins, its importance in pathological states, Ukr. biochem. J., **80**, **6**, 5 (2008).
2. Menshikov E.B., Zenkov N.K., Lankin V.Z., Oxidative stress: pathological states and diseases, 284 p. (ARTA, Novosibirsk, 2008).
3. Menshikov E.B., Zenkov N.K., Oxidative stress under inflammation, Impr. mod. biol., **117**, **2**, 155 (1997).
4. Yolkina N.M., Konoshenko S.V., Shashua I., Enzymatic activity of human erythrocytes under ischemic heart disease with oxidative stress, Scientific Notes of Taurida National V.I. Vernadsky University; Biology, chemistry, **24** (**62**), **2**, 124 (2011).
5. Novitski V.V., Goldberg V.E., Kolosova M.V., Protein specter of erythrocyte membranes of patients with lung cancer and tumours of head and neck, Bul. experim. biol. and med., **suppl. 1**, 18 (1999).
6. Pokrovsky A.A., Biochemical methods of clinical investigations, 450 p. (Medicine, Moscow, 1969).
7. Vladimirov U.A., Peroxidation of lipids in biological membranes, 252 p. (Science, Moscow, 1972).

*Поступила в редакцию 08.11.2014 г.*

**УДК 634.42:57.085.2**

## **ОРГАНОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРЕ РАЗЛИЧНЫХ ЭКСПЛАНТОВ ФЕЙХОА В УСЛОВИЯХ *IN VITRO***

***Иванова Н.Н., Митрофанова И.В.***

*Никитский ботанический сад – Национальный научный центр, Ялта, Россия  
E-mail: in\_vitro@ukr.net*

Исследованы особенности органогенеза в культуре высечек листа и сегментов побега растений фейхоа сорта Никитская Ароматная, а также перспективных крупноплодных форм Ф1 и Ф2 в условиях *in vitro*. Изучено влияние регуляторов роста НУК, ИУК, БАП и ТДЗ на индукцию побегообразования. Установлены эффективные концентрации ИУК и БАП, а также ТДЗ в питательной среде МС, индуцирующие регенерацию микропобегов из сегментов побега в условиях *in vitro*. Показано, что при использовании в качестве исходных эксплантов высечек листа на всех испытанных средах отмечено формирование неморфогенного каллуса.

**Ключевые слова:** фейхоа, экспланты, органогенез, регенерация, микропобег.

### **ВВЕДЕНИЕ**

Субтропические плодовые культуры являются источником наиболее важных компонентов питания человека. Климатические условия Крыма позволяют выращивать различные ценные субтропические культуры, среди которых особое место занимает вечнозеленое субтропическое растение фейхоа (*Feijoa sellowiana* Berg). Плоды фейхоа употребляются в свежем и переработанном виде. Традиционные методы вегетативного размножения имеют ряд ограничений, особенно когда необходимо получить за короткий период большое количество посадочного материала. Биотехнологические подходы, основанные на культивировании органов и тканей многолетних субтропических плодовых растений в условиях *in vitro* позволяют освободить растения от вирусной инфекции, а также решить проблему массового тиражирования ценных видов и сортов для пополнения генофонда и создания медленно растущих коллекций в условиях *in vitro*. Однако до настоящего времени не разработаны способы прямой и непрямой регенерации растений *in vitro* большинства сортов фейхоа отечественной селекции.

В настоящее время в НБС-ННЦ продолжаются исследования по изучению основных факторов, влияющих на процессы морфогенеза перспективных сортов и селекционных форм растений фейхоа в условиях *in vitro* [1-4]. Установлена зависимость регенерационной способности эксплантов от сроков введения первичных эксплантов, условий их стерилизации, состава питательной среды и условий культивирования.

Цель наших исследований – выявить особенности прямого и непрямого органогенеза различных эксплантов сорта Никитская Ароматная и перспективных

крупноплодных форм Ф1 и Ф2 и получить стабильную регенерацию микропобегов в условиях *in vitro*.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на базе лаборатории биохимии, биотехнологии и вирусологии растений НБС–ННЦ НААН Украины. Для исследований были выбраны растения фейхоа сорта Никитская Ароматная и перспективных крупноплодных селекционных форм Ф1 и Ф2 из коллекционных насаждений НБС–ННЦ. Для освобождения эксплантов от экзогенной инфекции применяли ступенчатую стерилизацию, которая выполнялась в следующей последовательности: растительный материал погружали в 70%-ный раствор этилового спирта (1 мин), затем в 0,45% раствор Дез ТАБ (10 мин) и 1% раствор Thimerosal (10 мин). После каждого реагента растительный материал промывали в стерильной дистиллированной воде. Экспланты помещали на модифицированную питательную среду Мурасиге и Скуга (МС) [5], дополненную зеатином. Для изучения органогенеза сегменты побега и высадки листьев культивировали на среде МС, дополненной регуляторами роста растений:  $\alpha$ -нафтилуксусной кислотой (НУК), индоллил-3-уксусной кислотой (ИУК), тидиазуроном (ТДЗ) и 6-бензиламинопурином (БАП) в различных комбинациях концентраций: 1) 8,06 мкМ НУК + 6,62 мкМ БАП, 10,74 мкМ НУК + 8,90 мкМ БАП, 16,11 мкМ НУК + 13,30 мкМ БАП; 2) 8,56 мкМ ИУК + 6,62 мкМ БАП, 11,42 мкМ ИУК + 8,90 мкМ БАП, 17,13 мкМ ИУК + 13,30 мкМ БАП; 3) 3,0; 6,0; 9,0; 12,0 и 15,0 мкМ ТДЗ. Контролем служила среда МС без регуляторов роста. Стерилизацию питательных сред осуществляли в автоклаве при давлении 0,7-0,8 атм. в течение 20-25 мин.

Колбы с изолированными эксплантами помещали в культуральную комнату с температурой 24-25° С, 16-часовым фотопериодом, интенсивностью освещения 2-3 клк. Субкультивирование эксплантов проводили через 3-4 недели. В процессе культивирования учитывали количество регенерировавших микропобегов с одного экспланта, проводили визуальный анализ сформировавшегося каллуса. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью прикладной программы «Математическая статистика», версия 6.0.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Культура органов и тканей является искусственной растительной системой. Помещая изолированную клетку в условия *in vitro*, реализацию ее тотипотентности можно направить по пути соматического эмбриогенеза и органогенеза [6]. Большинство растений фейхоа из коллекции НБС-ННЦ являются возрастностарыми. В связи с этим большой научный и практический интерес представляет изучение морфогенетических потенций органов и тканей взрослого растения в условиях *in vitro*. Взрослые растения размножаются намного сложнее, при этом могут быть источником ценных хозяйственных признаков. Известно, что работа с таким материалом затрудняется тем, что постепенно в тканях и органах растений происходят процессы, приводящие к ингибированию роста и регенерационной способности: часто полученные микропобеги характеризуются медленным ростом,

низкой способностью к укоренению и адаптации [7]. Вегетативные почки исследуемых растений фейхоа (30-40-летнего возраста) были введены в культуру *in vitro* в период с июня по сентябрь, с появлением на них новых побегов. Это позволило снизить уровень контаминации до 20%. После регенерации пазушных микропобегов (1-2 шт./эксплант) на модифицированной среде МС, дополненной 0,91-1,85 мкМ зеатина их черенковали на отдельные сегменты. В качестве исходных эксплантов для дальнейших исследований использовали листья с черешком с нанесением поранения по краю, а также сегменты побега размером 0,3 см с узлом.

Культивирование листьев и побегов в культуре *in vitro* на различных вариантах среды МС позволило выявить их различную способность к регенерации микропобегов. Известно, что развитие адвентивных побегов во многом зависит от типа экспланта. У многих растений экспланты листа обладают высоким морфогенетическим потенциалом и в присутствии в среде регуляторов роста способны к регенерации как соматических зародышей, так и адвентивных микропобегов [8].

На питательной среде МС без регуляторов роста индукцию органогенеза не наблюдали. Экспланты были зелеными в течение 15-18 суток, а затем темнели и погибали. Наши исследования показали, что введение в питательную среду НУК и БАП не индуцировало регенерацию микропобегов в культуре эксплантов листа и побега фейхоа. При культивировании эксплантов с регуляторами роста НУК и БАП, а также ИУК и БАП через 7-10 суток наблюдали формирование каллуса на черешке и по краю листа. Известно, что в сочетании ауксин и цитокинин индуцируют органогенез в культуре листа. Однако нами во всех вариантах опыта отмечено формирование неморфогенного каллуса ткани рыхлой консистенции серо-коричневой окраски. Регенерация микропобегов из такого каллуса не наблюдалась.

Культивирование сегментов побега с узлом на питательных средах с НУК и БАП показало, что во всех испытанных вариантах сред в основании побегов формировался неморфогенный рыхлый каллус. Вместе с тем на питательной среде с 11,42 мкМ ИУК + 8,90 мкМ БАП было получено по 1-2 микропобега/эксплант, которые визуально морфологически не отличались от нормальных побегов. Дальнейшее культивирование эксплантов фейхоа на среде аналогичного состава не способствовало увеличению коэффициента размножения. В связи с этим наши исследования были направлены на поиск других регуляторов роста, способных индуцировать процессы регенерации эксплантов фейхоа. Для индукции регенерационного потенциала растительной клетки в состав питательной среды МС был введен ТДЗ.

Известно, что разработка способа прямой регенерации адвентивных побегов из листьев и сегментов побегов древесных и кустарниковых растений с применением ТДЗ позволяет не только размножать растения, но и изучать процессы морфогенеза, которые индуцируются в клетках экспланта. Это соединение фенилмочевины является эффективным биорегулятором, который проявляет цитокининовую активность в различных системах, включая и органогенез из различных эксплантов для целого ряда растений [2, с. 199-201].

При использовании питательных сред, содержащих различные концентрации ТДЗ, у эксплантов фейхоа наблюдали прямую регенерацию микропобегов и каллусогенез. Так, при добавлении в питательную среду МС 3, 6, 9 и 12 мкМ ТДЗ через 3 недели культивирования эксплантов побега наблюдали образование вегетативных почек и микропобегов в зоне узла у 90% эксплантов фейхоа сорта Никитская Ароматная, 86% у эксплантов Ф2 и 80% – Ф1 (табл. 1).

**Таблица 1**  
**Регенерационный потенциал эксплантов побегов и листьев растений фейхоа на питательных средах с различными концентрациями ТДЗ**

Сорт	Тип первичного экспланта	Кол-во экспл. реген. побеги, %	Кол-во регенерировавших микропобегов/эксплант, шт.						
			концентрация ТДЗ, мкМ						
			0	1	3	6	9	12	15
1 Н.А.	лист	0	0	0	к	к	к	к	к
	побег	90±2,3	0	0	1,1±0,1	2,2±0,6	2,9±0,8	2,0±0,1	к
2 Ф1	лист	0	0	0	к	к	к	к	к
	побег	80±2,8	0	0	1,0±0,2	1,8±0,9	1,9±0,7	1,6±0,3	к
3 Ф2	лист	0	0	0	к	к	к	к	к
	побег	86±3,1	0	0	1,2±0,1	1,9±0,8	2,3±0,5	1,8±0,3	к

к – каллусогенез

Количество микропобегов, развивающихся из одного экспланта через 4 недели культивирования, составило 2-3 шт. (рис. 2). Отмечено образование нормальных микропобегов с 3-5 хорошо развитыми зелеными листьями. Формирования оводненных микропобегов не зафиксировано.



Рис. 2. Прямой органогенез в культуре эксплантов побега фейхоа формы Ф2 на среде МС, дополненной 12 мкМ ТДЗ

При культивировании на модифицированных питательных средах с различными сочетаниями ТДЗ (3-12 мкМ) более 4-х недель дальнейшее увеличение частоты адвентивного побегообразования не наблюдалось. Однако при этом происходило развитие эксплантов, что проявлялось в увеличении длины и толщины побега, а также размеров и числа листьев. У всех изучаемых растений фейхоа адвентивные микропобеги регенерировали без промежуточной каллусной стадии развития, что обеспечивало их генетическую стабильность. Повышение концентрации ТДЗ до 15 мкМ вызывало формирование рыхлого неморфогенного каллуса у эксплантов побега всех изучаемых растений.

На эксплантах листа каллус образовывался по его периметру в местах поранения, вдоль центральной жилки и на черешке; он был плотным и имел бело-зеленую окраску (рис. 3). При дальнейшем культивировании каллус некротизировался.



Рис. 3. Формирование каллуса в культуре эксплантов побега и листа фейхоа формы Ф2 на среде МС, дополненной 15 мкМ ТДЗ

В процессе исследований установлено, что частота регенерации микропобегов зависела и от генотипа растения фейхоа. Так, у сорта Никитская Ароматная количество микропобегов на среде МС с 9 мкМ ТДЗ составило  $2,9 \pm 0,8$  шт./эксплант, у формы Ф2 –  $2,3 \pm 0,5$  шт./эксплант, у формы Ф1 –  $1,9 \pm 0,7$  шт./эксплант.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Таким образом, в результате проведенных исследований изучены особенности морфогенеза растений в культуре изолированных эксплантов фейхоа сорта Никитская Ароматная и форм Ф1 и Ф2. Установлено, что в культуре сегментов побега регенерация микропобегов осуществлялась на среде МС, дополненной ТДЗ. Адвентивные микропобеги регенерировали прямым путем непосредственно из клеток экспланта, что обеспечило их генетическую стабильность. Максимальное

количество микропобегов –  $2,9 \pm 0,8$  шт./эксплант было получено у сорта Никитская Ароматная на среде МС, содержащей 9 мкМ ТДЗ.

#### Список литературы

1. Кондратенко О.Н. Влияние различных концентраций витаминов на рост и развитие растений фейхоа (*Feijoa sellowiana* Berg.) в культуре *in vitro* / О.Н. Кондратенко, И.В. Митрофанова // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия Биология. – 2003. – Т. 16 (55), №2. – С. 98-102.
2. Митрофанова И.В. Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологии получения и сохранения многолетних садовых культур / И.В. Митрофанова – К.: «Аграрная наука», 2011. – 344 с.
3. Иванова Н.Н. Особенности развития эксплантов фейхоа на этапе введения в условия *in vitro* / Н.Н. Иванова, И.В. Митрофанова, Е.Л. Шишкина // Ученые записки Таврического нац. ун-та им. В.И. Вернадского. Серия Биология. – 2012. – Т. 25 (64), 4. – С. 67-71.
4. Mitrofanova I.V. Development of recipient system of wood subtropical plants *in vitro* / I.V. Mitrofanova, O.V. Mitrofanova // Acta Universitatis Latveiensis. Biology. – 2004. – V. 676. – P. 189-196.
5. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays tobacco tissue culture / T. Murashige, F. Skoog // Physiol. Plant. – 1962. – V. 15, № 3. – P. 473-497.
6. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи / В.А. Кунах. – К.: Логос, 2005. – 730 с.
7. Mohan J.S. Somaclonal variation in breeding and propagation of ornamental crops / J.S. Mohan, De Klerk G-J. // Plant Tissue Culture and Biotechnology. – 1998. – V. 4, № 2. – P. 63-75.
8. Черевченко Т.М. Биотехнология тропических и субтропических растений *in vitro* / Т.М. Черевченко, А.Н. Лаврентьева, Р.В. Иванников. – К.: Наукова думка, 2008. – 559 с.

### ORGANOGENESIS IN THE CULTURE OF DIFFERENT FEIJOA EXPLANTS IN VITRO

*Ivanova N.N., Mitrofanova I.V.*

*Nikitsky Botanical Gardens – National Scientific Center, Yalta, Crimea, Russia  
E-mail: in\_vitro@ukr.net*

Peculiarities of *in vitro* organogenesis in the culture from leaf and stem segments of *Feijoa sellowiana* cultivar Nikitskaja Aromatnaja (Nikitskaja Fragrant) and perspective large-fruit forms F1 and F2 have been studied. It has been found out that regenerative ability correlates with the terms of the original explants interpolation, their sterilization conditions, composition of the culture medium and culture conditions. Leaves with petioles and segments of microshoots, grown in MS medium with 0.91-1.85 мкМ zeatin, were used as explants. Influence of such growth regulators as NAA, IAA, BAP and TDZ on the induction of shoots` formation *in vitro* has been researched. It has been determined that on the medium with BAP and NAA also BAP and IAA explants formed nonmorphogenic callus. Besides in MS medium added with 11.42 мкМ IAA and 8.9 мкМ BAP 1-2 shoots per explants were formed and they looked like normal shoots. Further culture of *Feijoa* explants in the same medium hasn't led to increasing of propagation coefficient. Under addition 3, 6, 9 and 12 мкМ of TDZ to the medium

regeneration of microshoots from the shoot segments have been noticed. The number of regenerated microshoots after 4 weeks of the culture was 4 shoots per explant. Feijoa explants` culture for more than four weeks in the modified mediums with TDZ didn`t give the increasing of shoots formation frequency. Only growth of shoots and leaves has been noticed. Shoots` regeneration took place without intermediate stage of callus formation that has provided their gene stability. Increasing of concentration up to 15 mkM led to formation of crumby nonmorphogenic callus in shoot segments in all studied plants. Our investigations have shown particular correlation between frequency of microshoots regeneration and genotype of Feijoa plant. It has been determined that for cultivar Nikitskaja Aromatnaja (Nikitskaja Fragrant) number of microshoots, in MS medium added with 9 mkM TDZ, was  $2.9\pm 0.8$  per explants, for form F2 they were  $2.3\pm 0.5$  per explants and for form F1 –  $1.9\pm 0.7$  per explants. It has been shown that using of the leaf parts as initial explants on all mediums added with different TDS concentrations led to the formation of light-green dense callus which necrotized during the further culture. Microshoots` regeneration hasn`t been noticed in any variant of the experiment. At the base of the results peculiarities of plants morphogenesis in the culture of isolated leaf parts and shoot segments in studied genotypes of Feijoa have been determined and possible ways for microshoots regeneration have been shown.

**Keywords:** Feijoa sellowiana, explants, organogenesis, regeneration, microshoot.

#### References

1. Kondratenko O.N., Mitrofanova I.V., Influence of various concentration of vitamins on growt and development of feijoa plants (*Feijoa sellowiana* Berg.) *in vitro*, Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University, Series Biology, chemistry, **16** (55), 2, 98-102 (2003).
2. Mitrofanova I.V., Somatic embryogenesis and organogenesis as a basis of obtaining and preservation of perennial horticultural plants, (Agrarnaj nauka, 2011).
3. Ivanova N.N., Mitrofanova I.V., and Shskina E.L., Peculiarities of development of feijoa explants in conditioi *in vitro* on the stape of introduction, Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University, Series Biology, chemistry, **25** (64),4, 67-71 (2012).
4. Mitrofanova I.V., Mitrofanova O.V., Development of recipient system of wood subtropical plants *in vitro*, Acta Universitatis Latveiensis. Biology, **676**, 189-196 (2004).
5. MurashigeT., A revised medium for rapid growth and bioassays tobaco tissue culture, *Physiol. Plant.*, **15**, 3, 473-497 ( 1962.)
6. Kunakh V.A.,Biotechnology of medicinal plants. Cenetic, physiological and biochemical basis, (Logos, 2005).
7. Mohan J.S., De Klerk G-J., Somaclonal variation in breeding and propagation of ornamental crops, *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, **4**, 2, 63-75 (1998).
8. Cherevchenko T.M., Lavrenteva A.N., Ivannikov R.V., Biotechnology of tropical and subtropical plants *in vitro*, (Naukova dumka, 2008).

Поступила в редакцию 12.11.2014 г.



**УДК 581.4: 582.632.2(477.75)**

## **RAPD-PCR ФРАКЦИИ ДНК КАК МАРКЕРЫ ЖЕСТКОСТИ И ОПУШЕННОСТИ ЛИСТЬЕВ ДУБА ПУШИСТОГО И СКАЛЬНОГО**

*Ивашов А.В., Симчук А.П., Оберемок В.В.*

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

С использованием метода RAPD-маркеров показано, что индивидуальные спектры амплифицированных фрагментов ДНК из дубов пушистого и скального содержат от четырех до десяти RAPD-маркеров. Наличие фракции ДНК длиной 400 пар нуклеотидов маркирует более высокий уровень опушенности и жесткости листьев дуба пушистого.

**Ключевые слова:** дуб пушистый, скальный, жесткость и опушенность листьев, RAPD-PCR, полиморфизм.

### **ВВЕДЕНИЕ**

Несмотря на бурное развитие современных методов анализа ДНК, использование RAPD-PCR (случайно амплифицируемая полиморфная ДНК) по-прежнему остается приемлемым методом в популяционных исследованиях самых разных видов. Хотя он и не дает информации о структуре и функциональной роли того или иного гена, зато позволяет исследовать генетическую изменчивость в случайно выбранном наборе участков генома [1]. Ранее маркирующие свойства фрагментов ДНК с использованием праймер ОРА-14 были обнаружены при оценке индивидуальных различий в накоплении микроэлементов в листьях дуба [2]. Для решения экологических задач связанных с поиском факторов устойчивости лесных насаждений к повреждению листогрызущими насекомыми такой поиск может быть перспективным на начальных этапах генетических исследований в экосистемах. Хорошо известно, что жесткость листьев дуба и их опушенность являются важными свойствами, которые в определенной мере определяют их доступность для листогрызущих насекомых. Так, ранее нами было установлено, что экологические ниши, занимаемые различными видами фитофагов, дифференцированы в зависимости от жесткости листа и рН [3–5]. В частности для зеленой дубовой листовертки было показано, что адаптация ее разных генотипических классов к листьям разной жесткости напрямую связана с выживанием и определяет поддержание оптимальной численности популяции [6]. Априори очевидно, что эти свойства кормовой листвы как фенотипические признаки определяются условиями среды, и генами растений. В этой связи в данной работе сделана попытка подобрать

случайно амплифицированные праймеры, пригодные для маркирования опушенности и жесткости листьев у дубов скального и пушистого.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследований служили 8 модельных деревьев дуба пушистого (*Quercus pubescens* Willd.), произрастающих на площадке «Дубки», два дерева дуба скального (*Q. petraea* Matuschka/Liebl.), произрастающие на площадке «Лавровое» Листья, собранные авторами с крымских дубов были также доставлены в лабораторию. Из массы свежих листьев, собранных с каждого дерева отбирали пробы для исследования генетического полиморфизма по RAPD-PCR.

Образцы ДНК выделяли, используя 0,5 см<sup>2</sup> свежего листа дуба. Экстракцию тотальной ДНК проводили согласно стандартной методике. Для исследования полиморфизма методом RAPD-PCR использовали праймер OPA-14 – TCTGTGCTGG (Operon Technologies, USA).

RAPD-PCR проводили в реакционной смеси, объемом 25 мкл на термоциклере «Герцик» (ДНК-Технология, Россия) с использованием реактивов для полимеразной цепной реакции GenePak™ PCR Universal (ИзоГен, Москва). Амплификацию проводили в режиме: 1 цикл денатурации 95<sup>0</sup> С в течение 5 мин и последующие 45 циклов по схеме: 95<sup>0</sup> С – 1 мин, 36<sup>0</sup> С – 1 мин, 72<sup>0</sup> С – 2 мин. Терминальную стадию синтеза проводили при 72<sup>0</sup> С – 10 мин.

Продукты амплификации разделяли методом электрофореза в 1,8 %-ном агарозном геле и после окрашивания бромистым этидием анализировали под ультрафиолетом. В качестве маркера использовали DNA-markers M 100 (ИзоГен, Москва) с длиной фрагментов 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 и 1000 пар нуклеотидов.

Жесткость листьев дубов пушистых определяли с использованием методики, предложенной П. Фини [7]. Степень опушенности листьев исследовали под бинокулярным микроскопом МБС-9. Для математической обработки полученных результатов применяли стандартные статистические процедуры с использованием возможностей программы MSExcel-XP.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Использование методики выявления случайно амплифицируемой полиморфной ДНК (RAPD) с применением стандартного праймера OPA-14 позволило получить в совокупности 11 RAPD-маркеров (рис.). Набор полученных маркеров достаточно хорошо отражает специфику каждого дерева дуба. В то же время, не было получено удовлетворительной картины полиморфизма и при использовании праймеров OPA-1 и OPA-8.

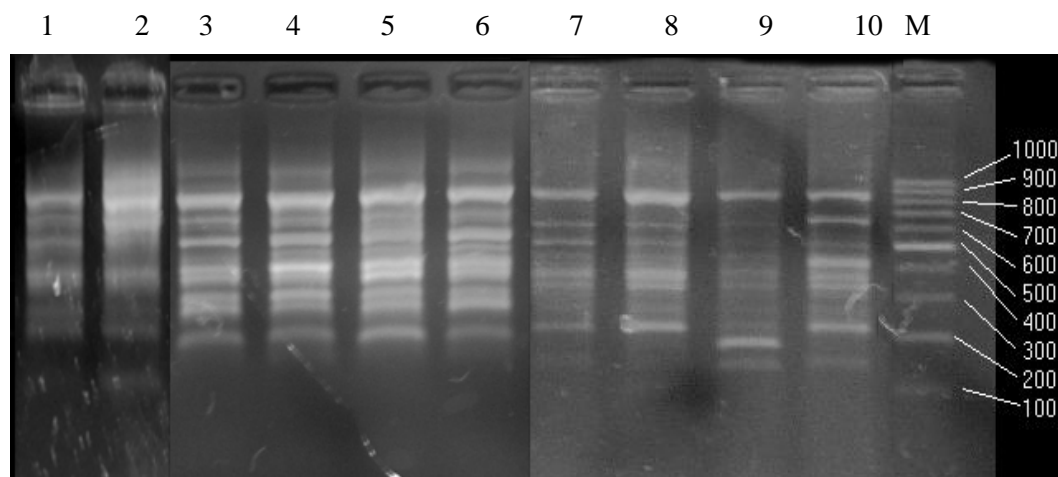


Рис. Индивидуальные электрофоретические спектры амплифицированных фрагментов ДНК деревьев дуба пушистого (1-8) и скального (9, 10) с праймером ОРА-14: М – маркеры молекулярных масс от 100 до 1000 п.н.

В целом, как видно на рисунке, анализируемые модельные деревья проявляют существенный генетический полиморфизм по набору полученных RAPD-маркеров. При этом индивидуальные спектры амплифицированных фрагментов ДНК содержали от четырех до десяти RAPD-маркеров.

Таким образом, использование методики полимеразной цепной реакции позволяет исследовать генетический полиморфизм дубов пушистого и скального. Наиболее информативным оказался праймер ОРА-14, применение которого позволило получить четкую воспроизводимую картину полиморфизма дубов по ДНК фрагментам.

Применение методики полимеразной цепной реакции с праймером ОРА-14 позволило охарактеризовать каждое из исследованных деревьев дуба по спектру случайно амплифицированных фрагментов ДНК. В то же время, для каждого дуба из популяции «Дубки» имеются данные по таким морфологическим признакам листьев, как жесткость их тканей и опушенность листовой пластинки. Это позволяет провести анализ наличия связей между данными морфологическими признаками и наличием или отсутствием той или иной фракции ДНК в RAPD-PCR спектре.

Только ДНК фракция длиной около 400 п.н. (№4) проявила связь с жесткостью и опушенностью листа (табл.). У модельных деревьев 3, 4 и 6, имеющих в RAPD-PCR спектрах эту фракцию ДНК и жесткость, и пушистость листьев оказалась в среднем выше, чем у деревьев 1, 2 и 5, в спектрах которых данная фракция отсутствует.

Таблица

**Жесткость и опушенность листьев дуба пушистого, различающихся по наличию или отсутствию фракции ДНК длиной 400 пар нуклеотидов**

Параметр	Жесткость листа (усл. ед)	Опушенность листа (волосков на 1мм <sup>2</sup> )
	Отсутствие фракции ДНК длиной 400 п.н.	
Среднее	4,73	33,50
Стандартная ошибка	0,05	2,42
Дисперсия выборки	0,22	628,03
Счет	110	107
	Наличие фракции ДНК длиной 400 п.н.	
Среднее	5,06	52,46
Стандартная ошибка	0,05	3,31
Дисперсия выборки	0,21	778,77
Счет	73	71
t-статистика	4,75	4,72
P	0,000004	0,000005

Вероятно, участок ДНК дуба, который проявляется как фракция длиной 400 п.н. несет в себе гены, влияющие на проявление таких морфологических признаков дуба, как жесткость его тканей и опушенность листовой пластинки. Эти признаки листа дуба в определенной степени характеризуют пищевую ценность и доступность листы дерева для насекомых-вредителей. В связи с этим, ДНК фракция длиной 400 п.н. может оказаться перспективной в отношении поиска генетических маркеров дуба, определяющих или влияющих на его устойчивость к вредителям.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

1. У дубов пушистого и скального по набору RAPD-маркеров обнаружен генетический полиморфизм. При этом индивидуальные спектры амплифицированных фрагментов ДНК содержали от четырех до десяти RAPD-маркеров.
2. Жесткость и опушенность листьев у дубов пушистых с наличием или отсутствием фракции ДНК длиной 400 пар нуклеотидов достоверно различается. Причем наличие этой фракции маркирует более высокий уровень опушенности и жесткости, что создает предпосылки использования этого молекулярного маркера для отбора плюсовых деревьев, устойчивых к повреждению листогрызущими насекомыми.

Настоящее исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Совета министров Республики Крым в рамках инициативного научного проекта 14-44-01591 «р\_юг\_а»

#### Список литературы

1. Sambrook J. Molecular Cloning: Laboratory Manual. / Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. – New York: Cold Spring Harbour Univ. Press, 1989. – 1626 p.
2. Пелецкая И.Г. Содержание тяжелых металлов на различных фенологических этапах развития листьев дуба пушистого / И.Г. Пелецкая, Г.Е. Бойко // Экосистемы Крыма их оптимизация и охрана. – Симферополь, 2002. – С. 94-98.
3. Simchuk A.P. Single oak tree as a heterogeneous resource for herbivores: inter-species differentiation of trophic niches / A.P. Simchuk, A.V. Ivashov // Экология та ноосферологія. – 2005. –Т. 16, № 1-2. – С.54–60.
4. Симчук А.П. Эколого-генетические аспекты дифференциации трофических предпочтений некоторых насекомых-филлофагов в микросообществах дуба / А.П. Симчук, А.В. Ивашов // Журнал общей биологии. –2005. –Т. 66, № 6. – С. 191-199.
5. Simchuk A.P. Genetics of Interactions among Moths, Their Host Plants and Enemies in Crimean Oak Forests, and Its Perspective for Their Control / A.P. Simchuk, V.V. Oberemok, A.V. Ivashov // Chapter 7 In: Moths: Types, Ecological significance and Control ; ed. Luis Cauteruccio. – New York : Nova Science Publishers, 2012. – P. 187-205.
6. Simchuk A.P. Genetic patterns as possible factors causing population cycles in oak leafroller moth *Tortrix viridana* L. / A.P. Simchuk, A.V. Ivashov, V.A. Companytsev // Forest Ecology & Management /– 1999. –V. 113. P. 35-49.
7. Feeny P. Seasonal changes in oak leaf tannins and nutrients as a cause of spring feeding by winter moth caterpillars / P. Feeny // Ecology, 1970. – Vol. 51. – P. 565-581.

#### RAPD-PCR DNA FRACTIONS AS THE MARKERS FOR LEAF STIFFNESS AND PUBESCENCE IN SESSILE AND PUBESCENT OAKS

*Ivashov A.V., Simchuk A.P., Oberemok V.V.*

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

Application of the RAPD-marker method with the OPA-14 primer for the analysis of genetic polymorphism in the pubescent and sessile oaks has shown that the individual spectra of amplified DNA fragments contain from four to ten RAPD-markers. At the same time use of OPA-1 and OPA-8 primers has shown no distinct polymorphism of amplified DNA fragments.

Leaf stiffness and pubescence associated in oaks with the presence or absence of DNA fraction of 400 bp in lengths. Moreover, the presence of this fraction marks a higher levels of pubescence and stiffness. Probably the region of the oak DNA, which manifests itself as a fraction of 400 bp in length, carries the genes that influence the expression of such the oak morphological traits as stiffness of its leaf tissues and pubescence of its leaf blade.

These characteristics of the oak leaf to a certain extent characterize its nutritional value and availability for foliage tree pests. In this regard, the DNA fraction of 400 bp in length (OPA-14 primer) may be promising in respect to finding of such the oak genetic markers, which should influence its resistance to pests. Thus, selection of “plus” trees that are resistant to damage the leaf-eating insects may be done among others in accordance to their molecular markers.

**Keywords:** pubescent oak, sessile oak, leaf stiffness, leaf pubescence, RAPD-PCR, polymorphism.

#### References

1. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. *Molecular Cloning: Laboratory Manual.* – New York: Cold Spring Harbour Univ. Press, 1626 p. (1989)
2. Peletskaya I.G., Boyko G.E. Heavy metal content at different phenological stages of leaf development in pubescent oak. *Crimean Ecosystems, their optimization and defense.* Simferopol, 94-98. (2002)
3. Simchuk A.P., Ivashov A.V. Single oak tree as a heterogeneous resource for herbivores: inter-species differentiation of trophic niches, **16**, № 1-2., 54–60. (2005)
4. Simchuk A.P., Ivashov A.V. Ecological-genetic aspects of differentiation of trophic preferences of some herbivores in oak micro-communities. *Journal of General Biology*, **66**, № 6, 191–199. (2005)
5. Simchuk A.P., Oberemok V.V., Ivashov A.V. Genetics of Interactions among Moths, Their Host Plants and Enemies in Crimean Oak Forests, and Its Perspective for Their Control // Chapter 7 In: *Moths: Types, Ecological significance and Control* ; ed. Luis Cauteruccio. – New York : Nova Science Publishers, 187-205. (2012)
6. Simchuk A.P., Ivashov A.V., Companiytsev V.A. Genetic patterns as possible factors causing population cycles in oak leafroller moth *Tortrix viridana* L. *Forest Ecology & Management*. **113**, 35-49. (1999)
7. Feeny, P. Seasonal changes in oak leaf tannins and nutrients as a cause of spring feeding by winter moth caterpillars. *Ecology*, **51**, 565-581. (1970)

*Поступила в редакцию 15.11.2014 г.*

**УДК 616.98+616-022.(33)477.75**

## **ДИНАМИКА ВЫЯВЛЕНИЯ ИНФИЦИРОВАННЫХ БЕШЕНСТВОМ ЖИВОТНЫХ В КРЫМУ**

*Кириллова А.В., Янцев А.В., Панова С.А., Щербина И.А.*

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

Установлено, что наименьшее количество носителей вируса бешенства регистрируется в июне, а наибольшее – в апреле. Выявлены два достоверных тренда в распространении инфицированных животных. Показано, что, начиная с 2006 года, значительно повысилась доля городских животных в общем количестве носителей вируса бешенства, связанное с увеличением численности бродячих кошек и собак, а также с низким качеством работы ветеринарных служб.

**Ключевые слова:** вирус, головной мозг, кошки, собаки, лисы, крупный рогатый скот, антирабическая вакцина.

### **ВВЕДЕНИЕ**

Бешенство – типичная зоонозная инфекция, возбудитель которой передается прямым контактным путем в результате укуса или ослонения поврежденных наружных слизистых оболочек или кожного покрова. Поэтому бешенство можно с полным основанием отнести к так называемым раневым инфекциям. Описано несколько случаев заражения в результате операции пересадки роговицы от умерших больных бешенством людей [1].

Болезнь встречается во все времена года и на всех континентах, за исключением некоторых островных территорий, таких как Япония, Австралия, Новая Зеландия, Исландия, острова Калимантан, Мартиника, Кипр, Мальта и др. Бешенство не регистрируется в Скандинавских странах, а также в Испании и Португалии. Но все-таки наибольшая заболеваемость бешенством встречается в летне-осенние месяцы, что обусловлено более тесным контактом людей с дикими животными и бродячими собаками. Заболевание регистрируется преимущественно среди сельского населения, чаще у детей [2].

Установлено, что повышенной чувствительностью к возбудителю бешенства отличаются дикие хищники семейства собачьих (лисица, енотовидная собака, волк, шакал, песец) и семейства куньих, а также летучие мыши, мангусты и другие виверровые, грызуны некоторых видов и домашняя кошка. Чувствительность человека, собаки, крупного рогатого скота, овец и коз, лошадей определяется как умеренная, средняя. Чувствительность птиц характеризуется как пониженная. Молодые животные более чувствительны к вирусу, чем взрослые [3–5].

Замечено, что штаммы рабического вируса, адаптированного к собакам или волкам, характеризуются особенно высокой тропностью к центральной нервной

системе и низкой – к висцеральным органам [6]. Поэтому вирус выделяется со слюной, но практически отсутствует в крови, моче, молоке больных животных. Соответственно, распространение болезни почти целиком зависит от возможности передачи вируса через укус. Алиментарное и аэрогенное заражение, в принципе возможно, но не имеют эпизоотологического значения [7]. Почти все случаи передачи бешенства от собак и волков человеку и сельскохозяйственным животным связаны с попаданием вирусосодержащей слюны в нанесенные при укусах раны. Изредка заражение происходит при попадании вирусосодержащей слюны на поврежденную кожу или на слизистые оболочки глаз, носовой полости [8]. Сохранение вируса бешенства в природе определяется длительностью инкубационного периода [4]. У лисиц он доходит продолжительностью до 275 дней. Это вполне достаточно для поддержания эпизоотического процесса на уровне спорадических случаев [7]. Лисицы очень чувствительны к вирусу бешенства, их чувствительность в десять раз выше, чем у обыкновенной полевки, что способствует быстрому распространению бешенства в популяции лисиц [1].

С учетом характера резервуара возбудителя, различают эпизоотии бешенства городского и природного типов [9]. При эпизоотиях городского типа основными источниками возбудителя и распространителями болезни являются бродячие и безнадзорные собаки. От их численности зависят масштабы эпизоотии [10].

При эпизоотиях природного типа болезнь распространяют в основном дикие хищники. Они очень чувствительны к вирусу, агрессивны, зачастую склонны к дальним миграциям, а при заболевании интенсивно выделяют вирус со слюной. Характерной особенностью современной эпизоотии природного бешенства в нашей стране является связь с зонами степи, лесостепи, островных смешанных и широколиственных лесов [11]. Локализация природных очагов болезни соответствует особенностям расселения лисиц, енотовидных собак, волков, песцов. Интенсивность эпизоотии зависит от плотности населения этих животных. Если она высока, болезнь быстро распространяется, заметно сокращая численность хищников. При средней плотности их населения бешенство проявляется единичными случаями в широком ареале, не вызывая заметного снижения численности хищников. При незначительной плотности популяций диких плотоядных эпизоотия затухает [12].

С изменением численности хищников связаны и циклические подъемы эпизоотии, чаще всего повторяющиеся с интервалом в 2-3 года. С этими подъемами закономерно сочетается расширение ареала болезни. При спадах эпизоотии на многих неблагоприятных территориях выявление случаев бешенства прекращается, но затем, при очередных подъемах, эпизоотия вновь охватывает временно освободившиеся от болезни местности [13, 14].

Эпизоотиям природного бешенства свойственны и сезонные подъемы. Число случаев болезни, как правило, возрастает осенью и в зимне-весенний период [1]. Это также связано с биологией основных распространителей болезни. Известно, что на январь-март приходится гон (период спаривания) лисиц с неизбежным соперничеством между самцами. В конце лета – начале осени покидают семейные участки и расселяется подросший молодняк, возникает борьба за удобные участки



обитания. Соответственно возрастает возможность заражения, что приводит к подъему заболеваемости. Помесячная динамика заболеваемости диких хищников определяет и характер сезонности бешенства собак, кошек, сельскохозяйственных животных. Однако следует учитывать, что в ряде регионов страны риск заражения сельскохозяйственных животных возрастает в летне-осенний (пастбищный) период [1, 15].

В связи с этим целью данной работы было провести анализ санитарно-эпидемиологической обстановки и выявить месячную и сезонную динамику распространения вируса бешенства в Крыму.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились на животных (кошки, собаки, лисы, крупный рогатый скот) с 2001 по 2010 годы. Животные проживали в различных условиях. Тестирование проводилось в независимости от времени года и суток.

В Регионарную государственную лабораторию ветеринарной медицины АР Крым из районных и городских ветеринарных служб доставлялся патологический материал, подозреваемых на бешенство животных. В лаборатории проводились исследования и фиксировались результаты, которые передавались в республиканскую санитарно-эпидемиологическую службу АР Крым, для контроля. При проведении лабораторных работ с вирусом бешенства и зараженными животными соблюдался режим, предусмотренный для работы с возбудителями особо опасных инфекций.

Для подтверждения диагноза бешенства проводили следующие исследования: 1). Исследование отпечатков роговицы, биопрепаратов кожи, с помощью методики флюоресцирующих антител; 2). Выделение вируса из слюны, слезной и спинно-мозговой жидкостей путем интрацеребрального заражения новорожденных мышей; 3). Выявление специфических антител в крови больного серологическими методами. При анализе полученных результатов использовался критерий хи-квадрат для сопоставления теоретически рассчитанных и фактически полученных значений, критерий хи квадрат для многопольных таблиц и критерий Пирсона-Павлика. С помощью компьютерной программы SPSS вычислялись показатели временных рядов: уровни рядов динамики, коэффициенты вариации, цепной и базисные приросты, цепной темп роста и темп прироста. Определялись параметры линий трендов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Месячная и сезонная динамика выявления инфицированных животных.

Наглядное представление того, как меняется видовая характеристика, в совокупности выявленных носителей вируса по месяцам, дает приводимая ниже гистограмма (рис.1)

Для решения вопроса о достоверности изменений был проведен статистический анализ ряда динамики (табл. 1).

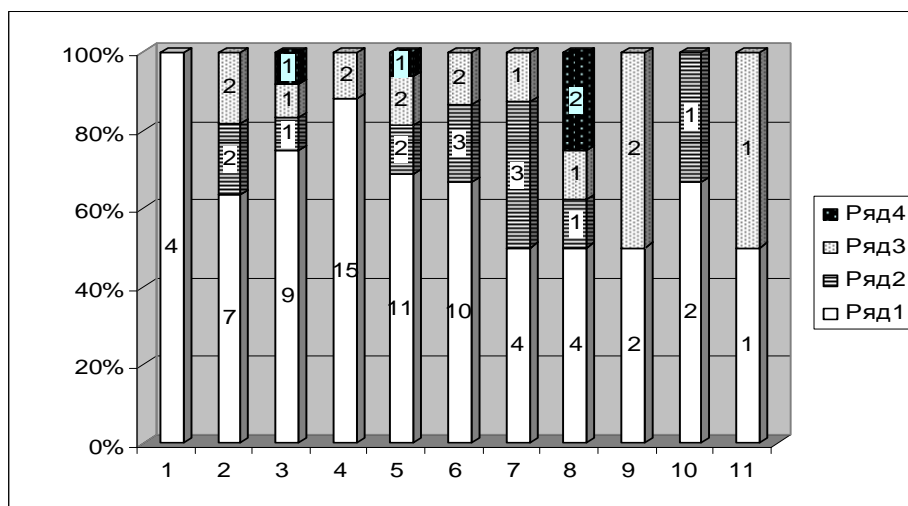


Рис.1. Видовая структура инфицированных животных по месяцам года.  
Ряд 1 – лисы; ряд 2 – кошки; ряд 3 – собаки; 4 – домашний скот  
Цифры под колонками гистограммы – порядковые номера месяцев.

**Таблица 1**  
**Основные статистические параметры временных рядов месячной динамики**

	порядковые номера месяцев											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Y <sub>i</sub>	13	14	15	20	8	5	6	8	7	8	10	11
Y <sub>i</sub> - Y	2,7	3,7	4,7	9,7	2,3	5,3	4,3	2,3	3,3	2,3	0,3	0,7
(Y <sub>i</sub> - Y) <sup>2</sup>	<b>7,3</b>	<b>13,7</b>	<b>22,1</b>	<b>94,1</b>	<b>5,3</b>	<b>28,1</b>	<b>18,5</b>	<b>5,3</b>	<b>10,9</b>	<b>5,3</b>	<b>0,9</b>	<b>0,5</b>
Y = 10,3; Σ(Y <sub>i</sub> - Y) = 213; σ <sup>2</sup> <sub>Y</sub> = 19,36; σ <sub>Y</sub> = 4,40; S <sub>Y</sub> = 1,27; V <sub>Y</sub> = 42,7% 42,7%												
Δ <sub>ц</sub>		1	1	5	-12	-3	1	2	-1	1	2	1
Δ <sub>б</sub>		1	2	7	-5	-8	-7	-5	-6	-5	3	2
T <sub>рц</sub> (%)		108	115,	154	62	38	46	62	54	62	77	85
T <sub>п</sub> (%)		<b>7,6</b>	<b>7,1</b>	<b>33,3</b>	<b>0,4</b>	<b>37,5</b>	<b>20,0</b>	<b>33,3</b>	<b>12,5</b>	<b>14,3</b>	<b>25,0</b>	<b>11,0</b>

Y<sub>i</sub> – уровни рядов динамики; Y – средняя хронологическая;  
 σ<sup>2</sup><sub>Y</sub> - дисперсия средней хронологической; V<sub>Y</sub> - коэффициент вариации;  
 Δ<sub>ц</sub> - цепной прирост (изменение); Δ<sub>б</sub> – базисный прирост;  
 T<sub>рц</sub> (%) – цепной темп роста; T<sub>п</sub> (%) – темп прироста.

Средняя хронологическая (Y) составила 10,3, а ее отношение к ошибке средней хронологической: 10,3/1,27 = 7,92, что значительно превышает табличное критическое значение (3,11) для уровня значимости p < 0,01.

Отсюда следует заключение о достоверности показателей ряда динамики.

Анализируя гистограмму, можно заметить, что наименьшее количество зарегистрированных укусов инфицированными лисами наблюдается в июне и июле, затем, постепенно увеличивается на протяжении осенних и зимних месяцев,

достигает максимальных значений в феврале и снова начинает снижаться. Вполне очевидно, что в холодные зимние месяцы, когда в лесу трудно найти пропитание, лисы проникают на территории населенных пунктов.

Изменения в численности других видов носителей вируса бешенства становятся более наглядны, если объединить их в общую группу домашних животных, основу которой представляют собаки и кошки (рис. 2).

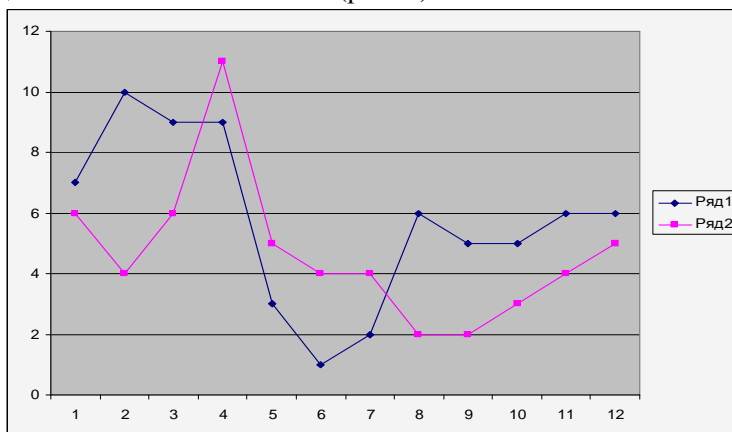


Рис. 2. Динамика укусов инфицированными животными в по месяцам  
Ряд 1 – дикие животные; ряд 2 – домашние животные.

На линии, характеризующей уровень укусов людей домашними животными, четко выделяется пик, восходящая часть которого начинается в феврале и продолжается до конца апреля. Увеличивающаяся продолжительность светового дня приводит к снижению продукции мелатонина в эпифизе и, как следствие, к уменьшению тормозных влияний на половые железы. В свою очередь половые гормоны изменяют поведение животных, делая их возбудимыми и агрессивными.

Суммарную динамику выявления носителей вируса бешенства по сезонам года представляет рисунок 3.

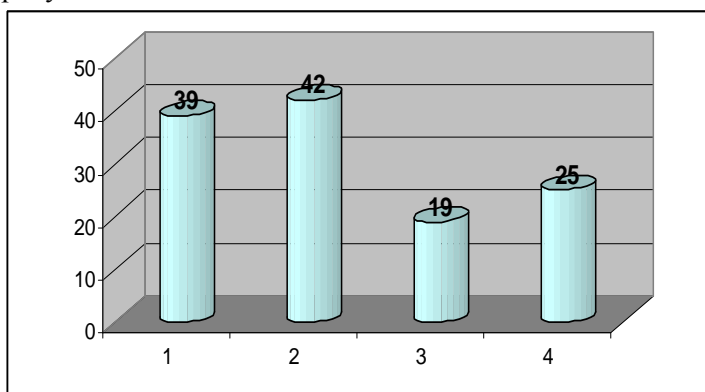


Рис. 3. Сезонная динамика укусов инфицированными животными  
1 – зима; 2 – весна; 3 – лето; 4 – осень

Интерпретируя график можно заключить, что наиболее опасным сезоном в отношении покусов инфицированными животными является весенний период, когда частота таких событий повышается на 25,8 % по отношению к средней хронологической величине ряда динамики ( $\bar{Y}=31$ ). В противоположность этому наиболее самым безопасным следует признать летний сезон, при котором частота выявления носителей вируса бешенства снижается на 38,7 %.

## 2. Выявление носителей вируса бешенства в период 2001 – 2010 годы.

Ниже приводится столбчатая диаграмма, характеризующая общую динамику изменений количества инфицированных животных (рис. 4.).

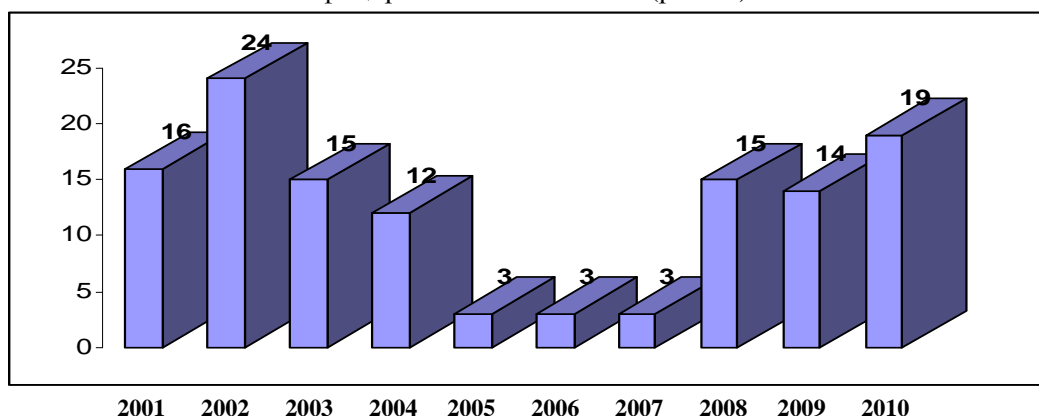


Рис. 4. Количественная характеристика обнаружения носителей вируса  
По оси абсцисс – годы;  
по оси ординат – количество инфицированных животных

Статистическая характеристика ряда динамики приводится в следующей таблице (табл.2) .

**Таблица 2.**  
**Основные статистические параметры временного ряда периода регистрации**

	ГОДЫ									
	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
$Y_i$	16	24	15	12	3	3	3	15	14	19
$Y_i - \bar{Y}$	5,7	13,5	4,7	1,7	7,3	7,3	7,3	4,7	3,7	8,7
$(Y_i - \bar{Y})^2$	32,5	182	22,1	2,9	53,3	53,3	53,3	22,1	13,7	75,7
$\bar{Y} = 10,3; \quad \Sigma(Y_i - \bar{Y}) = 511; \quad \sigma_Y^2 = 46,5; \quad \sigma_Y = 6,8; \quad S_Y = 2,15; \quad V_Y = 66,0\%$										
$\Delta_{ц}$		8	-9	-3	-9	0	0	12	-1	5
$\Delta_{б}$		8	-1	-4	-13	-13	-13	-1	-2	3
$T_{рц} (\%)$		113	33,3	300	-	-	-	-	8,3	500
$T_{п} (\%)$		<b>13</b>	<b>66,7</b>	<b>200</b>	-	-	-	-	<b>91,7</b>	<b>400</b>

$Y_i$  – уровни рядов динамики;  $\bar{Y}$  – средняя хронологическая;  
 $\sigma_Y^2$  - дисперсия средней хронологической;  $V_Y$  - коэффициент вариации;  
 $\Delta_{ц}$  - цепной прирост (изменение);  $\Delta_{б}$  – базисный прирост;  
 $T_{рц} (\%)$  – цепной темп роста;  $T_{п} (\%)$  – темп прироста.

Как и в случае анализа месячной динамики средняя хронологическая ( $\bar{Y}$ ) имела значение 10,3, а ее отношение к ошибке средней хронологической составило  $10,3/2,15 = 4,79$ , что превысило критическое табличное значение (3,11) для уровня значимости  $p < 0,01$ . Следовательно, показатели рядов динамики следует признать достоверными.

При сопоставлении хронологических уровней, представленных на графике 3.4.1, обращает на себя внимание провал в центре ряда динамики. Для более обстоятельного анализа изменений были рассчитаны и построены линии тренда (рис. 5.)

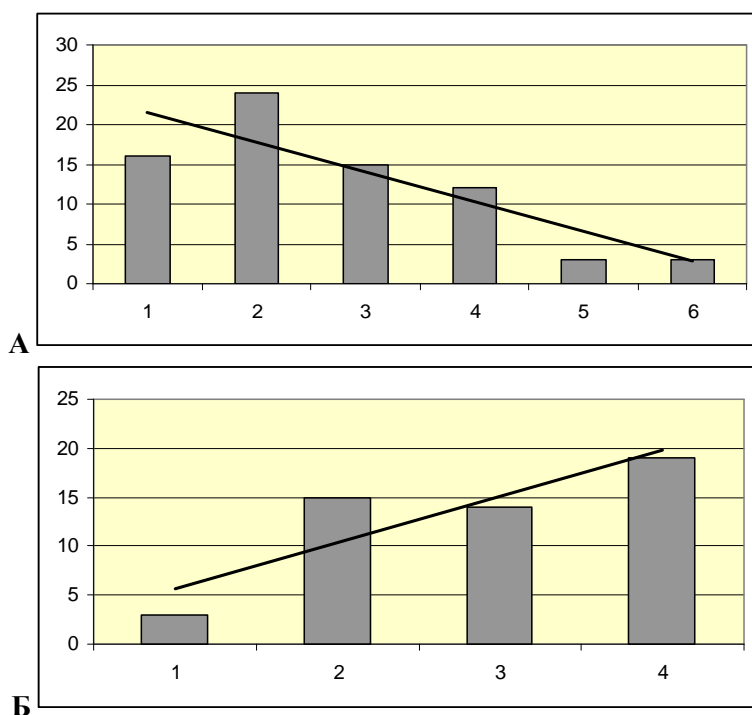


Рис. 5. Линии тренда регистрации инфицированных животных с 2001 по 2010 годы.

А – в период с 2001 по 2006 годы;

Б – в период с 2007 по 2010 год.

Применение углового преобразования Фишера позволило сделать заключения о достоверной смене трендов, начиная с 2007 года ( $p < 0,001$ ), что объясняется прекращением финансирования программы пероральной вакцинации. Ниже представлена видовая структура носителей вируса (рис.6).

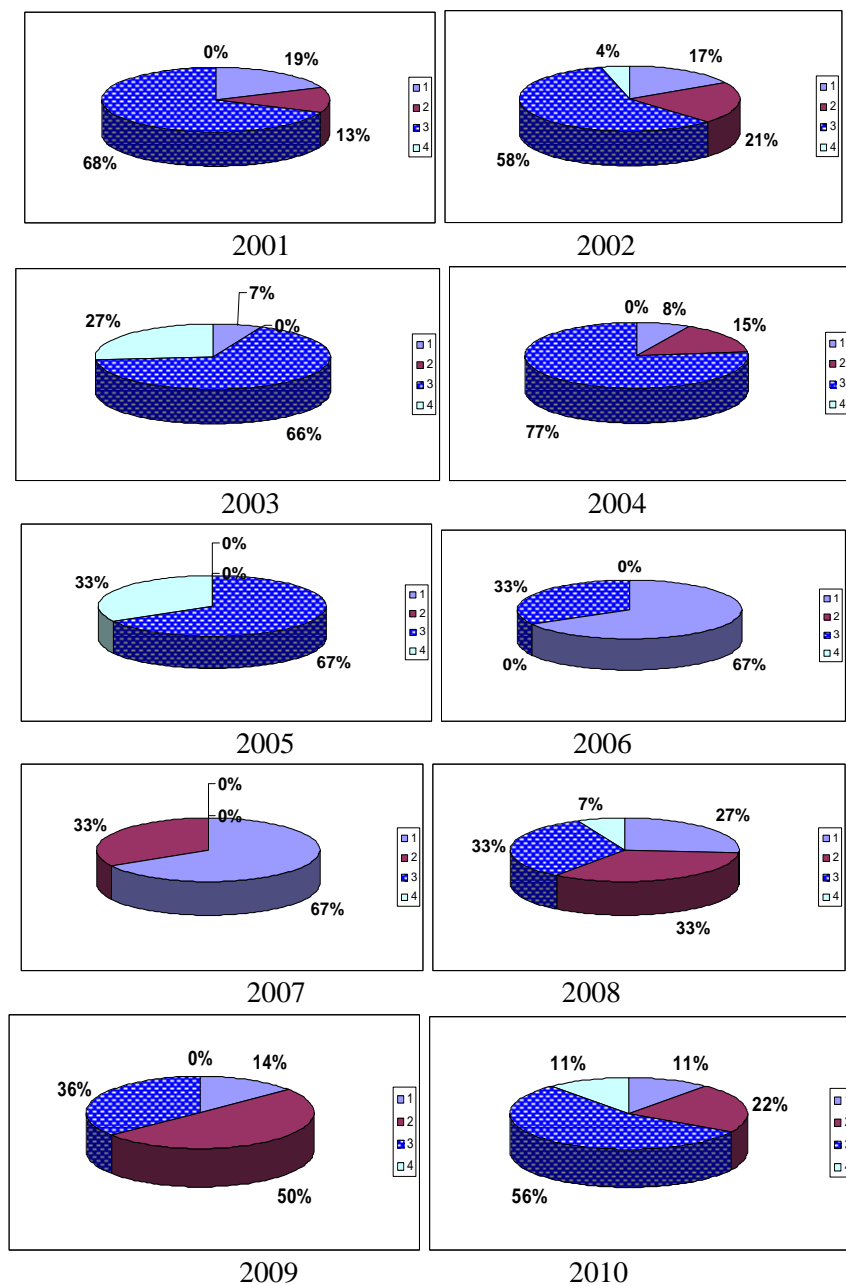


Рис. 6. Видовая структура носителей вируса в период 2001 – 2010 годы  
Ряд 1 – собаки, ряд 2 – кошки; ряд 3 – лисы; ряд 4 – иные.

Если же объединить всех городских животных в единую группу, то получим следующий ряд динамики (рис. 7.).

## ДИНАМИКА ВЫЯВЛЕНИЯ ИНФИЦИРОВАННЫХ БЕШЕНСТВОМ ...

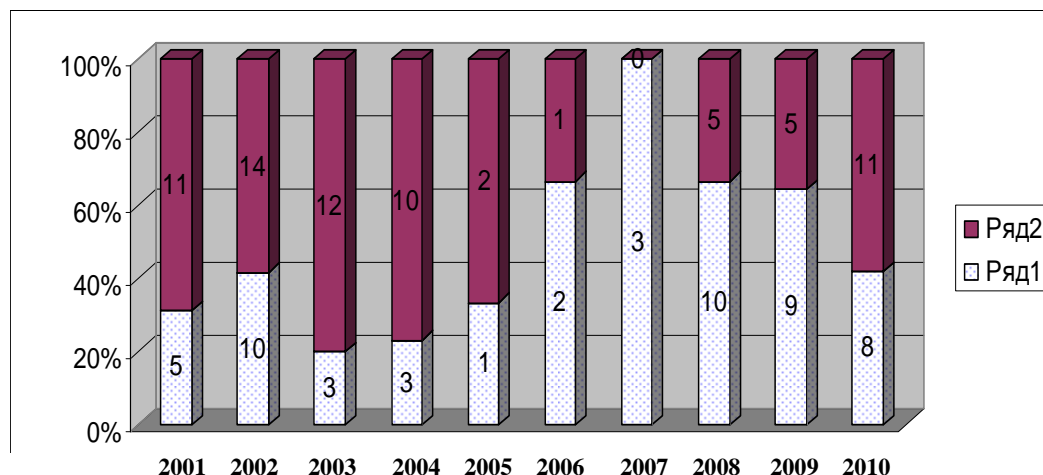


Рис. 7. Динамика выявления инфицированных животных за период с 2001 по 2010 годы.

Ряд 1 – городские животные; ряд 2 – лесные животные.

Из графика видно, что, начиная с 2004 года, повышается доля городских животных в общем количестве носителей вируса бешенства. Очевидно, это связано с увеличением численности бродячих кошек и собак, а также с низким качеством работы санитарно-эпидемиологических служб.

В связи с этим можно предложить в качестве рекомендации, обратить внимание на своевременное и регулярное проведение антиробических мероприятий и повысить качество работы санитарно-эпидемиологических служб.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Показано, что наименьшее количество носителей вируса регистрируется в июне, при этом количество укусов составляет 3,2 %, наибольшее количество – в апреле, на который приходится 16,1% всех выявленных случаев вирусносительства.
2. Выявлены два достоверных тренда в распространении инфицированных животных: отрицательный в период с 2001 по 2006 год, когда проводилась программа пероральной вакцинации диких животных, и положительный тренд в период с 2007 по 2010 год после прекращения финансирования этой программы.
3. Показано, что, начиная с 2006 года, значительно повысилась доля городских животных в общем количестве носителей вируса бешенства, связанное с увеличением численности бродячих кошек и собак, а также с низким качеством работы санитарно-эпидемиологических служб.

### Список литературы

1. Барсуков Л.И. Соросовский образовательный журнал / Л.И. Барсуков // Проблемы бешенства – 1998. – Т.5, №1. – С. 25-106.
2. Крупальник В.Л. Эпизоотологическая ситуация и эффективность проводимых мероприятий против бешенства / В.Л. Крупальник– М.:ПЭРСЭ, 2006. – С.105-208.
3. Беляков В.С. Эпидемиология / В.С. Беляков, Р.А. Яфаев– М.:ГЭОТАР-Медиа, 1989. – С.56-163.
4. Безденежных И.С. Эпидемиология / И.С. Безденежных– М.:ПЭРСЭ, 1987. – С. 258-270.
5. Зуев В.А. Медленные вирусные инфекции человека и животных / В.А. Зуев– М.:Медицина, 1988. – С.151-200.
6. Грибенча С.В. Вопросы вирусологии / С.В. Грибенча, И.С. Баринский– М.:ГЭОТАР-Медиа, 1987. – С.489-492.
7. Дудников С.А. Эпизоотическая ситуация по бешенству. Эпизоотологические аспекты / С.А. Дудников // Актуальные проблемы инфекционной патологии животных. – В.:ПЭРСЭ, 2003. – С.108-112.
8. Макаров В.В. Вестник академии сельскохозяйственных наук / В.В. Макаров // Реальная эпизоотология бешенства. – 2002. – Т.5, №8. – С. 102.
9. Вотяков В.И. Материалы международной научной конференции / В.И. Вотяков, Л.П. Титов, Н.П. Мишаева // Проблемы бешенства. – 1995. – Т.9, №4. – С.240-245.
10. Заводских А.В. Видовая эволюция бешенства животных / А.В. Заводских– М.:ПЭРСЭ, 2004. – С. 32-45.
11. Мовсеянц А.А. Ветеринарные и медицинские аспекты зооантропонозов / А.А. Мовсеянц // Реальная эпизоотология бешенства. – 2003. – Т.5, №3. – С.6.
12. Селимов М.А. Современная эпизоотическая ситуация и перспективы элиминации бешенства / М.А. Селимов– М.:Медицина, 1998. – С. 5.
13. Жданов В.М. Эволюция вирусов / Жданов В.М. – М.:Медицина, 1990. – 373 с.
14. Черкасский Б.Л. Эпидемиология и профилактика бешенства / Б.Л. Черкасский – М.:ПЭРСЭ, 1985. – С.46-78.
15. Бурлаков С.В. Профилактика Бешенства / С.В. Бурлаков– В.:ПЭРСЭ, 2002. – С. 8-9.

### **SPEAKER DETECTION OF ANIMALS INFECTED WITH RABIES IN THE CRIMEA**

*Kirillova A.V., Yantsev A.V., Panova A.S., Shcherbina I.A.*

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

Rabies is a typical zoonotic infection which pathogen is transmitted by direct contact through the bite or occlusion damaged outer mucous membranes or skin. The highest incidence of rabies is common in summer and autumn months, due to the more close contact people with wild animals and dogs. The disease is registered mainly among the rural population, more children [1–3].

It is established that the high sensitivity to the agent of rabies differ wild predators family dog (Fox, raccoon dog, wolf, Jackal, Fox) and the family of Martens, as well as bats, mongoose and other виверровы, some species of rodents and domestic cat. Human sensitivity, dogs, cattle, sheep and goats, horses defined as moderate average. The sensitivity of birds characterized by decreased. Young animals are more susceptible to the virus than adults [4–6].



Given the nature of the reservoir of the pathogen, distinguish the epidemic of rabies urban and natural types. When epizootic urban-type main sources of the pathogen and distributors diseases are stray and abandoned dogs. From their numbers depend on the scale of the epidemic [7–9]. When epizootic natural type of disease spread mainly wild predators. They are very sensitive to the virus, aggressive, often tend distant migration, and with the disease intensively emit virus with saliva.

Localization of natural foci of the disease corresponds to the specifics of settlement foxes, raccoon dogs, wolves, Arctic foxes. The intensity of the epidemic depends on the density of the population of these animals. If it is high, the disease spreads rapidly, considerably reducing the number of predators. The average density of their population rabies is manifested isolated cases in a wide range without any noticeable decrease in the number of predators. At low density of populations of wild carnivores epizooty of extinction [10–12].

With the change in the number of predators are connected and cyclical upturns of the epidemic, often repeated at intervals of 2-3 years. These rises naturally combines an extension of the disease. During the downturns of the epidemic on many disadvantaged areas identification of cases of rabies stops, but then, at subsequent rises, epizooty again covers temporarily freed from disease areas [13, 14].

Animal health natural rabies peculiar and seasonal rises. The number of cases, as a rule. Increases in the autumn and in the winter-spring period. This is also connected with the biology of the main distributors of the disease. It is known that for January-March have gon (pairing) foxes with the inevitable rivalry between males. At the end of summer - beginning of autumn leaves lots and settles a grown young, there's a struggle for comfortable habitats. Correspondingly increases the possibility of infection, which leads to a rise in morbidity. Monthly dynamics of morbidity wild predators determines a character seasonality rabies dogs, cats, farm animals. However, be aware that in some regions of the country risk of contamination of agricultural animals increases in summer-autumn (pasture) period [1, 15]. Revealed monthly and seasonal dynamics of the spread of rabies virus in the Crimea.

It is shown that the smallest number of virus carriers registered in June, the number of *нокысов* is 3.2 %, the highest in April, accounting for 16.1% of all diagnosed cases of virus bearing. Identification of two reliable trend in the spread of infected animals: negative in the period from 2001 to 2006, when the program was conducted oral vaccination of wild animals. And a positive trend in the period from 2007 to 2010, once the funding of this program. It is shown that, since 2006, significantly increased the share of urban animals in the total number of carriers of rabies virus associated with the increase in the number of stray cats and dogs as well as low quality of the sanitary epidemiological services.

**Keywords:** virus, brain, cats, dogs, foxes, cattle, rabies vaccine.

**References**

1. Badgers L. I. Soros educational journal, Rabies, **5**, 106 (1998).
2. Kupelnick C. L. Epidemiological situation and the effectiveness of measures against rabies, M.:PARSE, 105 (2006).
3. Belyakov C.S. Epidemiology, M.:GEOTAR-Media, 56 (1989)
4. Cash-strapped I.S. Epidemiology, M.:PARSE, 258 (1987).
5. Zuev Century A. Slow virus infection of humans and animals, M.:Medicine, 151 (1988).
6. Grebenka S.C. Questions Virolog, M.:GEOTAR-Media, 489 (1987).
7. Dudnikov S.A. Epizootic situation on rabies. Epizootological aspects / Actual problems of infectious diseases of animals, C:PERSE, 108 (2003).
8. Makarov V.V. Centuries Bulletin of the Academy of agricultural Sciences, Real epizootiology of rabies. - 5(8), 102(200).
9. Votyakov C.I., Titov L.P., Mirzaeva N.P. proceedings of the international scientific conference. *Problems of rabies*. **9** (4.), 240-245. (1995).
10. Factory A. C. Species evolution rabies animal, M.:PARSE, 32 (2004).
11. Movsesiantz A. A. Veterinary and medical aspects of zoonoses, Real epizootiology of rabies, 5(3), 6(2003).
12. Selimov M. A. Modern epizootic situation and prospects of eliminatio rabies, M.:Medicine, 5 (1998).
13. Zhdanov C. M. Evolution of viruses, M.:Medicine, 373 (1990).
14. Cherkasy B. L. Epidemiology and prevention of rabies, M.:PARSE, 46 (1985).
15. Burlakov, S. C. Prevention of Rabies, C.:PARSE, 8 (9), (2002)

*Поступила в редакцию 14.11.2014 г.*

**УДК 616-092.4:577.112.34**

## **ВЛИЯНИЕ ДАЛАРГИНА В МАЛЫХ ДОЗАХ НА БОЛЕВУЮ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ У КРЫС**

*Коренюк И.И., Минина Е.Н., Белоусова Ю.В., Чертаев И.В.*

*Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Россия  
E-mail: cere-el@yandex.ua*

В условиях тестов «горячая пластина», «горячая вода» и «электростимуляция» выявлено наличие дозозависимости анальгетической активности даларгина и пути её регуляции в диапазоне малых доз, что можно в значительной степени связать с феноменом различного механизма действия опиоидов при варьировании дозы. Обнаруженные в дозах 0,2 мкг/кг и 0,002 мкг/кг анальгетические эффекты даларгина могут быть проявлением ограничения стресс-реакции на стадии тревоги и формирования резистентности к действию стресса в ходе общего адаптационного синдрома. В дозе 0,02 мкг/кг анальгетический эффект даларгина не наблюдался, то есть определена принадлежность данной дозы к диапазону «мёртвой зоны».

**Ключевые слова:** даларгин, сверхмалые дозы, болевая чувствительность.

### **ВВЕДЕНИЕ**

Одной из актуальных проблем современной биологии и медицины является изучение действия препаратов, снижающих влияние острых стресс-факторов на организм. К универсальным стресс-лимитирующим системам, которые обеспечивают адаптацию к изменениям, вызванным действием экстремального фактора, является система эндогенных опиоидных пептидов [1-5]. Как известно, увеличение синтеза и секреции ряда регуляторных пептидов при развитии стресс-реакции наряду с инициацией адаптационных механизмов приводит к истощению нейрогуморальных и ферментативных систем организма. Уместно предположить, что введение извне компонентов стресс-лимитирующих систем будет способствовать не только усилению потенциальных возможностей организма, но и инициации синтеза биологически активных веществ, обладающих антистрессорным действием, в частности, противоболевым.

В качестве антистрессорных препаратов в клинической практике применяются синтетические аналоги эндогенных опиоидных пептидов, например, аналог лей-энкефалина даларгин (Тур-D-Ala-Gly-Phe-Ley-Arg), который используется в качестве противоязвенного препарата [6-8]. Этот гексапептид как неселективный агонист  $\mu$ - и  $\delta$ -опиатных рецепторов обладает широким спектром биологической активности (анальгетическая, иммуномодулирующая, антиоксидантная и т. д.) [9-16].

Есть сведения, что даларгин при однократном применении в терапевтических дозах (10-100 мкг/кг) проявляет в ряде случаев противоболевую активность, сопоставимую с эффектом морфина [9], но обладает ли подобными эффектами этот пептид в малых дозах до сих пор не известно.

Исходя из вышеизложенного, целью настоящей работы было изучение влияния малых доз даларгина (0,1, 0,01 и 0,001 мкг/кг) на электрокожную и температурную болевую чувствительность у крыс.

#### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Исследования проводили с соблюдением принципов, изложенных в Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей (Страсбург, Франция, 1986), а также с учетом требований «Декларации по использованию животных и уходу за ними», принятой Таврическим национальным университетом им. В.И. Вернадского.

Исследования выполнены на 60 половозрелых бодрствующих беспородных крысах-самцах массой 180-220 г., разделённых на 4 группы по 15 особей. Даларгин («Фармсинтез», г. Харьков, Украина) растворяли в физиологическом растворе и вводили животным экспериментальных групп внутривентриально в объёме 0,1 мл в дозах 0,1; 0,01 и 0,001 мкг/кг. Крысам контрольной группы вводили внутривентриально физиологический раствор в эквивалентном объёме. Острый болевой стресс моделировали в тестах «горячая вода», «горячая пластина» и «электростимуляция». Показатели болевой чувствительности животных оценивали во всех тестах через 30 минут после введения тестируемых растворов даларгина.

В тесте «горячая вода» хвост каждой крысы опускали в ёмкость с водой, нагретой до 53 °С. Латентный период болевой реакции (ЛПБР) фиксировали по значению времени (с), за которое крыса отдергивала хвост от горячей жидкости. Данный тест позволяет судить о болевой чувствительности животных преимущественно на спинальном уровне [21, 22].

В тесте «горячая пластина» крыс помещали в камеру, пол которой был нагрет до 45°С. ЛПБР животного определяли по значению времени (с) проявления реакции отдергивания и лизания конечностей и (или) вокализации. Тест позволяет судить о болевой чувствительности животных на супраспинальном уровне [21, 22].

В тесте «электростимуляция» крыс помещали в камеру с медной проволочной площадкой, через которую пропускали электрический ток (прямоугольные одиночные импульсы с частотой 40 Гц) от электростимулятора ЭСЛ-2. Болевой порог определяли по минимальному значению напряжения (V), вызывавшему реакцию вздрагивания и отдергивания от пола конечностей животного. Данный тест характеризует болевую чувствительность животных на спинальном и супраспинальном уровнях регуляции [21, 22].

Статистическую значимость различий средних величин вычисляли по t-критерию Стьюдента после проверки нормальности распределения изучаемых параметров.

#### **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Как показали наши исследования, степень выраженности анальгетического эффекта существенно зависела от применяемой дозы пептида. Очевидно, выявленная ранее многофазность кинетического действия [23] в зонах фармакологического действия препарата, может присутствовать и при действии доз,

близким к физиологическим. Механизм «ускользания» эффекта при увеличении дозы и нелинейная форма кривых «доза-эффект» [24] дают основания предположить о варьировании болевой чувствительности при применении малых доз даларгина.

Так, в дозе 0,2 мкг/кг даларгин в тесте «горячая вода» увеличивал ЛПБР на 83,5 % относительно контрольной группы ( $p < 0,01$ ; рис. 1). В данном тесте удлинение ЛПБР можно связать с модификацией процессов болевой трансмиссии и модуляции, обусловленные способностью даларгина осуществлять протективное действие на клетки чувствительных ганглиев задних корешков спинного мозга [18].

Так как изменения ЛПБР в тесте «горячая пластина» при действии даларгина в дозе 0,2 мкг/кг зафиксировано не было (рис. 1), можно полагать, что супраспинальные механизмы болевой чувствительности оказались менее чувствительны к этой дозе.

В тесте «электростимуляция» даларгин в дозе 0,2 мкг/кг (рис. 1) увеличивал болевой порог на 52,1 % ( $p < 0,01$ ) относительно контроля. Это с учётом данных теста «горячая пластина» указывает на противоболевую активность препарата на спинальном уровне.

Наблюдаемый анальгетический эффект даларгина в дозе 0,2 мкг/кг можно объяснить депрессорным влиянием опиоидных пептидов на систему циклических нуклеотидов, концентрация которых при воздействии экстремальных факторов эмоциональной и болевой природы повышается [25]. Как известно, действие опиоидных пептидов, основано на угнетении активности аденилатциклазы и, как следствие, снижении концентрации цАМФ в клетке, что ведет к торможению ряда физиологических реакций, усугубляющих стресс-повреждения систем организма [25, 26].

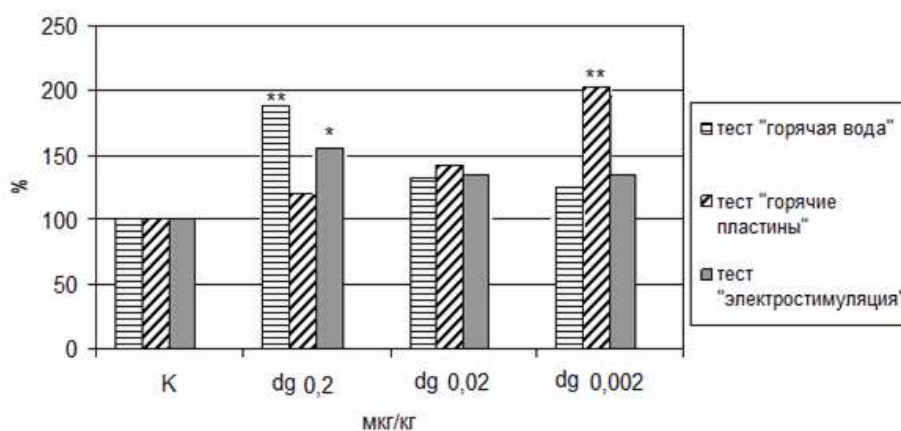


Рис.1. Влияние малых доз даларгина на показатели болевой чувствительности крыс в тестах «горячая вода», «горячая пластина» и «электростимуляция».

*Примечание:* К – контрольная группа; dg – даларгин в концентрации; \* – различия показателей достоверны по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ ); \*\* – ( $p < 0,01$ ).

Такое изменение концентрации циклических нуклеотидов в клетке при воздействии стресс-фактора приводит к значительному снижению возбудимости нейронов и оказывает влияние на транспорт нейротрансмиттеров. С учётом высокой периферической опиоидной активности даларгина [6] и соответствия его дозы 0,2 мкг/кг концентрации биологических жидкостей *in vivo* ( $10^{-12}$ - $10^{-10}$  М), можно предположить, что на фоне известного «триггерного» механизма действия опиоидных пептидов [23] формируется резонансный эффект во взаимодействии «рецептор-лиганд», активирующий сложные регуляторные цепи, каскады и (или) индукцию для высвобождения других регуляторных пептидов [11, 27, 28]. Такой подход соответствует концепции И.П. Ашмарина о регуляторном континууме и объясняет пролонгированное действие регуляторных пептидов [1, 2] даже в малых дозах [24].

В дозе 0,02 мкг/кг даларгин не оказывал достоверного влияния на температурную (тесты «горячая вода», «горячая пластина») и электрокожную (тест «электростимуляция») болевую чувствительность крыс по сравнению с контролем (рис. 1). Это свидетельствует о принадлежности этой дозы к так называемой «мёртвой зоне» - диапазону доз, в котором отсутствует биологический эффект вещества. Как известно, наличие «мёртвых зон» характерно для действия различных биологически активных веществ в малых и сверхмалых дозах, что является проявлением универсальных закономерностей «расслоения» и полимодальности их биологического эффекта [29, 30].

Снижение дозы вводимого крысам даларгина до 0,002 мкг/кг сопровождалась проявлением противоболевой активности данного препарата только на супраспинальном уровне анальгезии, поскольку лишь в тесте «горячая пластина» было выявлено повышение ЛПБР на 51,1 % ( $p < 0,01$ ). Как известно, центральное анальгетическое действие пептидов реализуется преимущественно через дельта-рецепторы гипоталамуса и стриатума [31], оказывая тормозное действие на одну из главных супрасегментарных зон – ретикулярную формацию ствола головного мозга. Через связи ретикулярной формации с гипоталамусом, базальными ядрами и лимбическим мозгом реализуется нейроэндокринный и мотивационный аффективный компонент боли, который вызывает чувство спокойствия и изменяет эмоциональную окраску боли. Дельта-рецепторы согласно [9] имеют способность связываться с лигандами даларгина (0,002 мкг/кг), активировать специфическую цепь внутриклеточных событий и приводя к более активному ответу клетки-мишени. В нашем случае это могло послужить основой наблюдаемых нами изменений поведенческих реакций крыс.

В отношении даларгина известно, что в механизмах его действия при стрессе важное значение имеет стимулирующее влияние как на периферические дельта-опиатные рецепторы, так и на нейрональные структуры мозга, [24], а также на тормозную ГАМК-эргическую систему [32]. Обнаруженные нами в различных малых дозах анальгетические эффекты даларгина могут быть проявлением ограничения стресс-реакции на стадии тревоги и формирования резистентности к действию стресса в ходе общего адаптационного синдрома [1, 2, 13].

Следует отметить, что высказанные здесь гипотезы о механизме действия даларгина в малых дозах нуждаются в дальнейших исследованиях и требуют экспериментального подтверждения. Нами планируется провести серии опытов, которые помогут детально выяснить роль опиоидергических и моноаминергических механизмов в анальгетических и антистрессорных эффектах даларгина.

В целом, наши исследования показали наличие дозозависимости анальгетической активности даларгина и пути её регуляции в диапазоне малых доз, что можно в значительной степени связать с феноменом различного механизма действия опиоидов при варьировании дозы [24].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Даларгин в диапазоне малых доз снижает болевую чувствительность крыс, задействуя в зависимости от дозы различные пути её регуляции.

1. В дозе 0,2 мкг/кг препарат увеличивает на 83,5 % ЛПБР относительно контроля в тесте «горячая вода» и на 52,1 % - в тесте «электростимуляция», что свидетельствует об анальгетическом действии препарата с участием спинального уровня регуляции болевой чувствительности.
2. В дозе 0,02 мкг/кг не наблюдается анальгетический эффект даларгина, т. е. определена принадлежность данной дозы к диапазону «мёртвой зоны».
3. В дозе 0,002 мкг/кг даларгин повышал ЛПБР на 51,1 % только в тесте «горячая пластина», что говорит об участии супраспинальных структур в анальгетическом эффекте данной дозы этого препарата.

### Список литературы

1. Ашмарин И.П. Малые пептиды в норме и при патологии / И.П. Ашмарин // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 1982. – № 4. – С. 13–27
2. Ашмарин И.П. Перспективы практического применения и некоторые фундаментальные исследования малых регуляторных пептидов / И.П. Ашмарин // Вопр. мед. химии. – 1984. – № 3. – С. 2–7.
3. Бобков А.И. О значении лей-энкефалина в механизмах стрессорной реакции / А.И. Бобков, И.Е. Семавин, В.А. Виноградов и др. // Тез. докл. Всесоюз. Конфер. "Нейропептиды: их роль в физиологии и патологии". – Томск: Изд-во Томского ун-та, 1985. – С. 161–162.
4. Вакулина О.П. Содержание опиоидных пептидов в различных тканях животных при экстремальных воздействиях: дис. ... канд. биол. наук :14.00.32 / Вакулина Ольга Павловна. – М., 1984. – 170 с.
5. Лишманов Ю.Б. Опиоидные нейропептиды, стресс и адаптационная защита сердца / Ю.Б. Лишманов, П.Н. Маслов – Томск: Изд-во Томского ун-та, 1994. – 354 с.
6. Коробов Н.В. Даларгин – опиоидоподобный пептид периферического действия / Н.В. Коробов // Фармакология и токсикология. – 1988. – № 4. – С. 35–38.
7. Лишманов Ю.Б. О механизме антистрессорного действия Д-ала2-лей5-арг6-энк / Ю.Б. Лишманов, Л.М. Маслов, М.И. Титов // Бюл. экспер. биол. мед. – 1985. – № 9. – С. 268–270.
8. Пашутин С.Б. Синтетические пептиды биорегуляторы в обеспечении адаптации организма к экстремальным воздействиям: дис. ... доктора биол. наук. : 14.00.16 / Пашутин Сергей Борисович. – М., 1991. – 380 с.
9. Слепушкин В.Д. Нейропептиды, их роль в физиологии и патологии / В.Д. Слепушкин, Г.К. Золотов, В.А. Виноградов, М.И. Титов // Томск: Изд-во Томского ун-та, 1988. – 143 с.

10. Захарова О.Ю. О модулирующем влиянии энкефалинов на реакции системы крови при иммобилизационном стрессе: дис. ... канд. мед. наук. : 14.00.16; 14.00.25 / Захарова Ольга Юрьевна – Томск, 1988. – 114 с.
11. Игнатов Ю.Д. Гетерогенность опиоидных рецепторов мозга и свойства их лигандов / Ю. Д. Игнатов // В сб. "Нейрофармакологическая регуляция болевой чувствительности". – Л.: Лениздат, 1984. – С. 9–93.
12. Лишманов Ю.Б. Роль эндогенных опиоидных пептидов в механизмах антиаритмического эффекта адаптации / Ю.Б. Лишманов, П.Н. Маслов, А.В. Крылатов, Е.В. Ускина // Физиол. журн. –1996. – Т. 82, № 5–6. – С. 56–59.
13. Лишманов Ю.Б. Роль опиоидной системы в адаптации организма и защите сердца при стрессе / Ю.Б. Лишманов, П.Н. Маслов, Т.В. Ласукова // Усп. физиол. наук. – 1997. – Т. 28, № 1. – С. 75–97.
14. Шурин М.Р. Иммуномодуляторные свойства опиоидных пептидов / М.Р. Шурин // Иммунология. – 1988. – Т. 26. – С. 168–173.
15. Bhargava H.N. Opioid peptides, receptors, and immune function / H.N. Bhargava // NIDA. Res. Monogr. – 1990. – V.96. – P. 220–233.
16. Duggan A. W. Enkephalins as transmitters in the central nervous system / A.W. Duggan // Circ Res. – 1980. – V.46. – N. 6. – Suppl. 1. – P. 149–153.
17. Брагин Е.О. Нейрохимические механизмы регуляции болевой чувствительности / Е. О. Брагин // М.: Изд-во Университета дружбы народов, 1991. – 248 с.
18. Енин Л.Д. Воздействие опиоидных пептидов мозга на сенсорные окончания кожи как один из механизмов анальгетического эффекта / Л.Д. Енин, Г.Н. Акоев, В.П. Лебедев, И.П. Потехина // В сб. докл. научн. конфер."Физиологическое и клиническое значение регуляторных пептидов". – Пушкино, 1990. – С. 55–63.
19. Калюжный Л. В. Физиологические механизмы регуляции болевой чувствительности / Л. В. Калюжный // М.: Медицина, 1984. – 215 с.
20. Костерлиц Т.В. Развитие концепций опиатных рецепторов и их лигандов / Т.В. Костерлиц, Д. Хьюс // В кн. "Эндорфины", под ред. Коста Э., Трабукки М. – М.: Мир, 1981. – С. 43–55.
21. Лебедева Н.Е. Эффекты фентанила в сверхмалых дозах. / Н.Е. Лебедева, Т.В. Головкина, Е.Н. Горбатова // Химическая и биологическая безопасность. – 2003. – № 9–10. – С. 7–8.
22. Ахметова Г.С. Синтез и фармакологические свойства нового гомолога отечественного производства оригинального анальгезирующего лекарственного средства Просидол. / [Г.С. Ахметова, А.К. Амантаева, К.Д. Пралиев и др.] // Изв. Томск. политех. ун-та. – 2010. – Т. 317, № 3. – С.140–143.
23. Нейропептиды в экспериментальной и клинической практике (Сбор. науч. тр. под ред. В.Г. Смагина). – 1986. – С. 80–85.
24. Смагин В.Г. Лиганды опиатных рецепторов: Гастроэнтерологические аспекты. / В.Г. Смагин, В.А. Виноградов, С.А. Булгаков // М.: Наука – 1983. – 272 с.
25. Майзелис М.Я. Об участии циклических нуклеотидов в механизмах действия энкефалинов / М.Я. Майзелис, А.А. Заблудовский, С.Н. Шихов // Бюл. exper. биол. мед. – 1982 – № 3 – С. 33–35.
26. Белоконь Л.Е. Особенности обмена нейропептидов гипоталамуса и гормонов гипофиза при стрессе и некрозе миокарда: дис. ...канд.биол.наук. : 03. 00.13 / Белоконь Л.Е. – Днепропетровск, 1991. – 125 с.
27. Ашмарин И.П. Нейропептиды в синаптической передаче / И.П. Ашмарин, М.А. Каменская // Физиология человека и животных. – 1988. – Т. 34 – С.184–192.
28. Ерошенко Т.М. Каскадные эффекты регуляторных пептидов / Т.М. Ерошенко, С.А. Титов, Л.Л. Лукьянова // Физиология человека и животных. – 1991. – Т. 46. – С. 203.
29. Бурлакова Е.Б. Действие сверхмалых доз биологически активных веществ и низкоинтенсивных физических факторов / Е.Б. Бурлакова, А.А. Конрадова, Е.Л. Мальцева // Химическая физика. – 2003. – Т. 22, № 2. – С. 21–40.
30. Гирин С.В. Перспективы клинического использования сверхмалых доз в биологии и медицине / С.В. Гирин // Биологическая терапия. – 2009. – № 2. – С. 4–8.
31. Калюжный Л.В. Физиологические механизмы регуляции болевой чувствительности / Л. В. Калюжный. – М.: Медицина. – 1984. – 215 с.



32. Хайсман И.Д. Роль периферических катехоламинергических систем в антистрессорном действии нейропептидов / И.Д. Хайсман, Ю.П. Арефолов // Бюл. экспер. биол. мед. – 1991. – № 6. – С. 328–333.

### THE EFFECT OF DALARGIN IN SMALL DOSES ON PAIN SENSITIVITY IN RATS

*Koreniuk I.I., Minina E.N., Belousova Y.V., Cheretaev I.V.*

*Tavrida National V.I. Vernadsky University, Simferopol, Russia  
E-mail: cere-el@yandex.ua*

One of the urgent problems of modern biology and medicine is the study of the action of drugs that reduce the effect of acute stress on the body. The universal stress-limiting systems that provide adaptation to changes caused by extreme factor is the system of endogenous opioid peptides. As is known, increasing the synthesis and secretion of a number of regulatory peptides in the development of stress reactions along with the initiation of adaptive mechanisms leads to depletion of neurohumoral and enzyme systems of the body. It is appropriate to assume that the introduction of the external components of the stress-limiting systems will contribute not only to strengthening the capacities of the organism, but also the initiation of synthesis of biologically active substances with anti-stress effect, in particular, analgesic.

The aim of this work was learning the influence of small doses of dalargin (0.1, 0.01 and 0.001 mkg/kg) on electric and thermal pain sensitivity in rats.

Studies were performed in compliance with the principles set forth in the Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other purposes (Strasbourg, France, 1986), and subject to the requirements of the "Declaration on the use of animals and care for them", adopted the Tavrida National V. I. Vernadsky University.

Studies were conducted on 60 adult waking outbred rats male weighing 180-220 g, were divided into 4 groups of 15 animals. Dalargin ("Pharmsynthez", Kharkov, Ukraine) was dissolved in saline and was administered to the animals of the experimental groups intraperitoneally in a volume of 0.1 ml at doses of 0.1; 0.01 and 0.001 mkg/kg to Rats of control group were injected intraperitoneally with saline in the equivalent volume. Acute pain stress was simulated in the tests "hot water", "hot plate" and "electrostimulation". The indicating of pain sensitivity in animals was evaluated in all of the tests within 30 minutes after administration of the test solutions of dalargin.

As shown by our study, the severity of analgesic effect was significantly dependent on the applied dose of the peptide. Obviously identified early multi-phase kinetic steps in the areas of pharmacological action of the drug may be present and the effects of doses close to physiological. The mechanism of "escaping" effect with increasing dose and non-linear shape of the curves "dose-effect" suggest about the variation in pain sensitivity when using low doses of dalargin.

Under the conditions of the tests "hot plate", "hot water" and "electrical" detect the presence of dose response dalargin analgesic activity and the ways of its regulation at low doses, which can be largely attributed to the phenomenon of different mechanism of

action of opioids at varying doses. Detected at doses of 0.2 mkg/kg and 0.002 mkg/kg analgesic effects of dalargin may be a manifestation of stress-limiting reaction in step anxiety and the development of resistance to the action of stress during the general adaptation syndrome. At a dose of 0.02 mkg/kg analgesic effect of dalargin was not observed, that is, determined the identity of a given dose to the band "the dead zone".

**Keywords:** dalargin, ultra-low doses, pain sensitivity.

### References

1. Ashmarin I.P., Small peptides in health and disease, *Pathological physiology and experimental therapy*, **4**, 13 (1982).
2. Ashmarin I.P., Prospects of practical application and some basic research small regulatory peptides / I. P. Ashmarin, *Questions of medical chemistry*, **3**, 2 (1984).
3. Bobkov A.I., Semain I.E., Vinogradov V.A., etc., On the value of lei-enkefalina in the mechanisms of stress reactions, *Proc. Dokl. Vsesojuzn. Conf. 'Neuropeptides: their role in physiology and pathology'*, 161-162 p. (Publishing house of Tomsk University, Tomsk, 1985).
4. Vakulina O.P., The content of opioid peptides in various tissues of animals during extreme influences: dis. ... Cand. Biol. Sciences :14.00.32, 170 p., (Moscow, 1984).
5. Lishmanov Y.B., Maslov P.N., Opioid neuropeptides, stress and adaptation protection of the heart, 354 p. (Publishing house of Tomsk University, Tomsk, 1994).
6. Korobov N.V., Dalargin – opioid-like peptide peripheral actions, *Pharmacology and toxicology*, **4**, 35 (1988).
7. Lishmanov Y.B., Maslov L.M., Titov M.I., On the mechanism of anti-stress action D-ala<sup>2</sup>-leu<sup>5</sup>-arg<sup>6</sup>-enk, *Bul. Exp. Biol. Med.*, **9**, 268 (1985).
8. Pashutin S.B. Synthetic peptide bioregulators in ensuring adaptation to extreme stress: dis. ... Dr. Biol. Sciences. : 14.00.16, 380 p. (Moscow, 1991).
9. Slepeshkin C.D., Zoloyev G.K., Vinogradov V.A., Titov M.I., Neuropeptides and their role in physiology and pathology, 143 p (Publishing house of Tomsk University, Tomsk, 1988).
10. Zakharova O. Yu. About a modulating effect of enkephalins on the reaction of the blood system in immobilization stress: dis. ... Cand. Med. Sciences. : 14.00.16; 14.00.25, 114 p (Tomsk, 1988).
11. Ignatov Y.D., Heterogeneity of opioid receptors in the brain and the properties of their ligands, In Proc. "Neuropharmacological regulation of pain sensitivity", p. 9-93 (Lenizdat, Leningrad, 1984).
12. Lishmanov Y.B., Maslov P.N., Krylatov A.V., Uschina E.V., Role of endogenous opioid peptides in the mechanisms of anti-arrhythmic effect of adaptation, *Fiziol. J.*, **82 (5-6)**, 56, (1996).
13. Lishmanov Y.B., Maslov P.N., Laskova T.V., Role of the opioid system in adaptation and protection of the heart during stress, *Usp. Fiziol. Sciences*, **28 (1)**, 75 (1997).
14. Shurin M.R., Immunomodulatory properties of opioid peptides, *Immunology*, **26**, 168 (1988).
15. Bhargava H.N., Opioid peptides, receptors, and immune function, *NIDA. Res. Monogr.*, **96**, 220 (1990).
16. Duggan A.W., Enkephalins as transmitters in the central nervous system, *Circ Res.*, **46 (6, Suppl. 1)**, 149, (1980).
17. Bragin E.O. *Neurochemical mechanisms of regulation of pain sensitivity*, 248 p. (Publishing house of peoples' friendship University, Moscow, 1991).
18. Yong L.D., Akoyev G.N., Lebedev V.P., Potekhina I.P., Effects of opioid peptides in the brain on sensory endings in the skin as a mechanism of analgesic effect, In: *Proc. the Scientific. Conf. "Physiological and clinical significance of regulatory peptides"*, 55 (Pushchino, 1990).
19. Kalyuzhny L.V. *Physiological mechanisms of regulation of pain sensitivity*, 215 p. (Medicine, Moscow, 1984).
20. Kosterlitz T.V., Hughes D., The development of the concepts of opioid receptors and their ligands, *In the book. "Endorphins"*, 43 (Mir, Moscow, 1981).
21. Lebedeva N.E., Golovkina T.V., Gorbatova E.N., Effects of fentanyl in extremely low doses, *Chemical and biological safety*, **9-10**, 7 (2003).
22. Akhmetov G.S., Amantayeva A.K., Prelievi K.D. and other, Synthesis and pharmacological properties of a new homologue of original analgesic drug Procidol, *Izv. Tomsk. Polytech. Univ.*, **317 (3)**, 140 (2010).

23. Neuropeptides in experimental and clinical practice (The Collection. Sci. Tr. by ed. V.G. Smagina), 80 (1986).
24. Smagin V.G., Vinogradov V.A., Bulgakov S.A., *The Ligands of opioid receptors: Gastroenterological aspects*, 272 p. (Nauka, Moscow, 1983).
25. Miselis M.Ya., Zabludowski A.A., Shikhov S.N., About the involvement of cyclic nucleotides in the mechanisms of action of enkephalins, *Bul. Exp. Biol. Med.*, **3**, 33 (1982).
26. Belokon L.E. Features of metabolism of neuropeptides in the hypothalamus and pituitary hormones under stress and necrosis of the myocardium: dis. ...Cand. Biol. Sciences. : 03. 00.13, 125 p. (Dnepropetrovsk, 1991).
27. Ashmarin I.P., Kamenskaya M.A., Neuropeptides in synaptic transmission, *Physiology of humans and animals*, **34**, 184 (1988).
28. Eroshenko T.M., Titov S.A., Lukyanova L.L., Cascading effects of regulatory peptides, *Physiology of humans and animals*, **46**, 203 (1991).
29. Burlakova E.B., Conradova A.A., Maltseva E.L., Effect of ultra-low doses of biologically active substances and low-intensity physical factors, *Chemical physics*, **22** (2), 21 (2003).
30. Girin S.V., Prospects for clinical use of ultra-low doses in biology and medicine, *Biological therapy*, **2**, 4 (2009).
31. Kalyuzhny L.V., *Physiological mechanisms of regulation of pain sensitivity*, 215 p. (Medicine, Moscow, 1984).

Поступила в редакцию 29.10.2014 г.

УДК 612.1+612.2]-053.7:612.766.1

## ОСОБЕННОСТИ ВЕНТИЛЯЦИОННОГО КОНТРОЛЯ ЮНОШЕЙ 19-20 ЛЕТ С РАЗНЫМ УРОВНЕМ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ РЕЗЕРВОВ КАРДИОРЕСПИРАТОРНОЙ СИСТЕМЫ

*Минина Е.Н.*

*Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Россия  
E-mail: cere-el@yandex.ua*

Проведено исследование 40 здоровых юношей 19-20 лет с разным уровнем функциональных резервов. Выявлена корреляционная зависимость между показателями ИН и  $pCO_2$  в выдыхаемом воздухе на пике регуляторного напряжения при прохождении точки респираторной компенсации (RCP) и вентиляторного ПАНО, что подтвердило значимость совершенствования функциональных взаимоотношений в понижении цены и повышении успешности адаптации.

**Ключевые слова:** функциональные резервы, нагрузочное тестирование, внешнее дыхание.

### ВВЕДЕНИЕ

Многоуровневая регуляция кардиореспираторной системы в обеспечении газового гомеостаза организма в процессе адаптации к физической нагрузке во многом определяется уровнем функциональных резервов и оптимальностью энергообеспечения [1]. При этом граница перехода приспособительных процессов в компенсаторные является подвижной, а её динамичность лимитируется не только морфо-функциональными ресурсами, но и особенностями регуляторных межсистемных взаимодействий. При анализе интегративного ответа на физическую нагрузку, вовлекающего респираторную, сердечно-сосудистую, кроветворную и мышечную системы [2, 3], важно знать изменения физиологических механизмов компенсации, участвующих в транспорте и утилизации кислорода, а также, количественно определять уровень регуляторной оптимальности в качестве адаптационного резерва [4, 5]. В таком случае, выявление скрытых звеньев приспособительного механизма при его компенсаторном значении может позволить своевременно и эффективно производить коррекцию у лиц с нарушением функционирования или с низкими функциональными резервами, а так же успешно выбирать реабилитационные и тренировочные технологии в спортивной и оздоровительной деятельности.

Так по данным [6], дисбаланс вентиляционного контроля со сниженными параметрами максимального потребления кислорода и гемодинамики, позволяет использовать его как маркер для стратификации больных ИБС с хронической сердечной недостаточностью.

Вероятно, при поддержании газового гомеостаза, у лиц с различным уровнем функциональных резервов, кардиореспираторная дисрегуляция при переходе на процессы компенсации выражена в разной степени.

В связи с вышесказанным, **целью** данной работы явилось выявление особенностей прохождения этапа вентиляционной компенсации у юношей 19-22 лет с разным уровнем функциональных резервов кардиореспираторной системы.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось на базе факультета физической культуры и спорта ТНУ им. В.И.Вернадского в период с 15 сентября по 15 ноября 2013 года и на базе футбольного клуба «Таврия» в период с 3 июня по 25 июля 2013 года. Было обследовано 40 практически здоровых юношей в возрасте 19-20 лет с разным уровнем двигательной активности и уровнем тренированности. Первую группу составили 20 футболистов, у которых общий объём двигательной активности составляет не менее 2 часов в день., а во вторую группу вошли 20 студентов, не занимающиеся регулярно физическими упражнениями. Для решения поставленных задач проводились исследования кардиореспираторной системы в покое, при выполнении нагрузки и на 3 минуте восстановительного периода. С помощью велоэргометра моделировали ступенчато-возрастающую нагрузку мощностью 50 Вт, 100 Вт, 150 Вт, 200 Вт, 250 Вт. В течение нагрузочного теста исследовали параметры кардиогемодинамики с помощью метода импедансной реографии с использованием прибора Reo Com Standart. Анализировали ударный объём (УО, мл) и систолическую (Ас, мВ) и диастолическую (Ад, мВ) амплитуды. Вычисляли диастолический индекс (DI, ед.) по формуле  $DI = Ad / Ac$ . С помощью капнографа «Еламед» определяли частоту дыхания (ЧД, ед), содержание углекислоты в выдыхаемом воздухе (РЕТСO<sub>2</sub>, мм рт. ст.). Используя спирограф «Спиро» измеряли объём дыхания за минуту (VE, л), пиковую объёмную скорость (PEV л/с), уровень максимальной вентиляции (MVC, %), процент утилизации кислорода (ΔFO<sub>2</sub>, об%). С помощью газоанализатора «КП-01» определяли скорость выделения углекислого газа (VCO<sub>2</sub>). Расчитывали вентиляторный эквивалент (ВЭСO<sub>2</sub>,ед.) по углекислому газу по формуле  $VE/VCO_2$ , ед., отражающий объём минутной вентиляции необходимый для выделения 1 л CO<sub>2</sub>. Точку респираторной компенсации (RCP), которая характеризует переход на преимущественно анаэробное энергообразование и отражает вентиляционный порог анаэробного обеспечения (ПАНО), определяли по динамике вентиляторного эквивалента (момент резкого усиления вентиляции по отношению к VCO<sub>2</sub>).

Дополнительно измеряли показатели variability сердечного ритма и анализировали резервы миокарда с использованием прибора «ФАЗАГРАФ®». Исследовались следующие функциональные показатели: индекс вагосимпатического баланса (LF/HF, ед), показатель индекса напряжения регуляторных систем (ИН, ед).

Анализ полученных результатов проводился с использованием программы STATISTICA V.6.0. Для оценки достоверности отличий, после предварительной проверки нормальности распределения использовали t-критерий Стьюдента,

критерий Манна-Уитни и критерий Вилкоксона. Корреляционный анализ проводили с использованием критерия ранговой корреляции Спирмена.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе были определены межгрупповые различия функциональных резервов кардиореспираторной системы. Как известно, аэробные возможности определяются совокупностью функционирования физиологических систем организма, обеспечивающих поступление кислорода и его утилизацию в тканях, а показатель МПК является интегральным маркером функциональных резервов кардиореспираторной системы. В нашем исследовании у юношей первой группы его значения превысили значения показателя МПК второй группы на 33,3 % ( $p < 0,001$ ), достигая уровня относительного МПК  $50,1 \pm 1,1$  мл/мин/кг. При этом, динамика показателей кардиогемодинамики у спортсменов при ступенчато-возрастающей нагрузки указывала на экономичность и эффективность функционирования сердечно-сосудистой системы (табл.1). На фоне гипокINETического типа кровообращения (СИ –  $2,6 \pm 0,1$  л/(мин • м<sup>2</sup>)) и менее выраженного прироста ЧСС при выполнении нагрузки 250 Вт у спортсменов отмечалось сохранение оптимальной диастолической функции миокарда и стабильный УИ. Восстановительный период у исследованных спортсменов характеризовался стабилизацией ЧСС, а во второй группе значения ЧСС на 55,2 % ( $\leq 0,001$ ), превышали исходные показатели в покое.

**Таблица 1**  
**Показателей кардиогемодинамики в группах юношей 19-20 лет с разным уровнем тренированности при увеличении внешней нагрузки, ( $\bar{x} \pm Sx$ ), n=40**

Показатели	гр	Условия						
		покой	50 Вт	100 Вт	150 Вт	200 Вт	250 Вт	восст
ЧСС, уд/мин	1	59,7±3,5	63,4±3,1	73,5±2,1	90,1±2,5	116,3±3,5	132,1±3,0	67,6±2,1
	2	71,5±3,1 **	83,0±2,9 ***	97,0±3,5 ***	134,1±3,2 **	151±3,1 ***	172±4,1 ***	111,4±3,2 ***
УИ, усл.ед.	1	56,6±4,0	60,1±3,1	57,1±6,1	55,7±5,5	51,4±4,9	50,0±4,1	51,8±4,1
	2	29,1±4,1* **	34,6±4,8 ***	33,4±4,9 ***	34,1±5,2 ***	34,2±4,8 **	31,1±3,9 ***	23,9±3,2 ***
DI, ед	1	0,40±0,01	0,40±0,01	0,41±0,01	0,37±0,03	0,35±0,01	0,33±0,01	0,4±0,01
	2	0,59±0,01 ***	0,59±0,01 ***	0,60±0,01 ***	0,57±0,01 ***	0,54±0,01 ***	0,49±0,01 ***	0,61±0,01 ***

Примечание: \*- различия показателей достоверны по сравнению с группой 1 ( $p < 0,05$ ); \*\*- ( $p < 0,01$ ); \*\*\*- ( $p < 0,001$ ); 1- группа спортсменов, 2- группа студентов-неспорсменов.

Эргоспирометрия обеспечивает глобальную оценку интегративного ответа на физическую нагрузку, вовлекающего легочную, сердечно-сосудистую, кроветворную и мышечную системы [7]. С её помощью было оценено состояние физиологических механизмов компенсации органов и систем, участвующих в транспорте и утилизации кислорода у исследуемых обеих групп. В результате сравнительного анализа резервов системы дыхания исследуемых обеих групп можно отметить отсутствие различий в резервах мощности по показателю PEV, л/с. При этом было зафиксировано превышение значений резервов мобилизации по показателю отношения легочной вентиляции к уровню максимальной вентиляции ( $VE/MVC$ , %) на 13,5 % ( $< 0,05$ ) и резервов эффективности по показателю процента утилизации кислорода ( $\Delta FO_2$ , об%) на 17,4 % ( $< 0,05$ ) у исследуемых спортсменов первой группы (рис.1.).

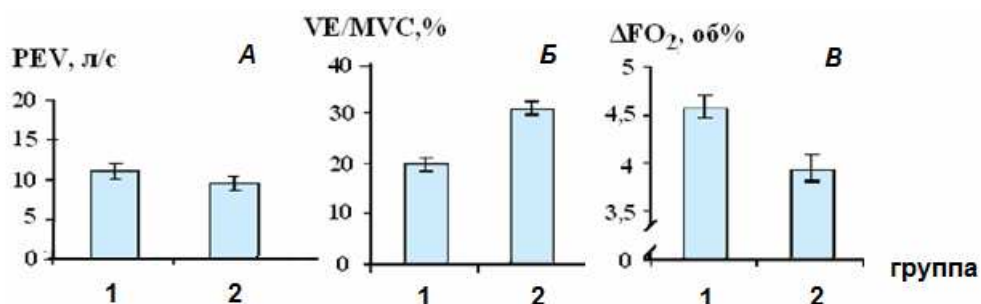


Рис.1. Сравнительная характеристика резервов мощности (А), мобилизации (Б) и эффективности (В) системы внешнего дыхания у исследуемых первой (1) и второй (2) групп при выполнении нагрузки 150 Вт

С целью оценки оптимальности регуляции по показателю ваго-симпатического баланса определяли тип вегетативного тонуса и тип дыхания в зависимости от содержания  $CO_2$  в выдыхаемом воздухе. Большинство (73,5 %) спортсменов первой группы была присуща ваготония и 74,8 % имело нормокапнический тип дыхания, а оставшаяся часть (26,5 % и 25,2% соответственно) проявляла признаки нормотонии и гиперкапнии. В группе студентов количество лиц с нормокапническим типом составило 50 %, гипокапнический тип имело 20 % обследуемых, гиперкапнический тип 30 %, что сопровождалось перераспределением вегетативного тонуса в сторону симпатикотонии у 41 % исследуемых, нормотонии- у 40 % и ваготонии – у 19 % (рис.2.).

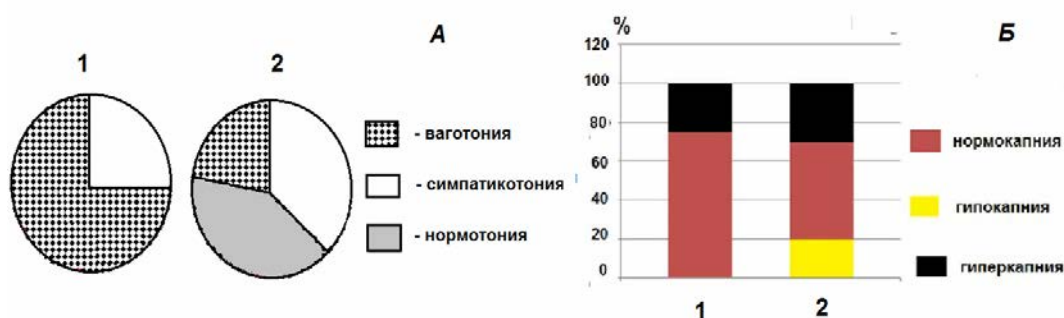


Рис.2. Распределение типов вегетативного тонуса (А) и типов дыхания (Б) в группах юношей 19-20 лет с разным уровнем функциональных резервов кардиореспираторной системы

При этом динамика напряжения регуляторных механизмов по показателю ИН свидетельствовала о значительном его приросте у исследуемых 2 группы (табл.2).

Таким образом, расширение функциональных резервов кардиореспираторной системы у юношей 19-20 лет сопровождалось оптимизацией регуляторных механизмов и характеризовалось низкими значениями ИН при увеличении внешней нагрузки (табл.2).

Таблица 2

Динамика индекса напряжения (ИН) и его корреляционной взаимосвязи с показателем  $РЕТСО_2$  ( $R$  ИН- $РЕТСО_2$ ) в группах юношей 19-20 лет с разным уровнем функциональных резервов кардиореспираторной, ( $x \pm Sx$ ),  $n=40$

Группа	Показатели	Покой	50 Вт	100 Вт	150 Вт	200 Вт	250 Вт	Вос-ние 3 мин
1	ИН, ед	58	65	55	68	71	<b>140</b>	87
	$R$ ИН- $РЕТСО_2$	-	-	-	-	-	0,61§	-
2	ИН, ед	98	71	84	<b>190**</b>	<b>210***</b>	<b>305**</b>	<b>350**</b>
	$R$ ИН- $РЕТСО_2$	-	-	-	-	-	-	-

Примечание: различия показателей между группами по критерию Манна-Уайта: \*\*- ( $p < 0,01$ ), \*\*\*- ( $p < 0,001$ ); достоверность ранговой корреляции Спирмена: §- ( $p < 0,05$ ); различия показателей относительно покоя по критерию Вилкоксона: *курсив*- ( $p < 0,05$ ).

Как видно из таблицы 2 степень напряжения механизмов регуляции по показателю ИН значимо различалось в группах на последних ступенях нагрузочного тестирования. Выявление особенностей компенсаторных механизмов в процессе адаптации составили второй этап исследований.

Как известно, значительное снижение  $ВЭСО_2$  при увеличении мощности выполняемой нагрузки расценивается как порог перехода организма на



неэкономичный режим работы, поскольку с развитием утомления в функционирующих тканях истощаются запасы бикарбонатов, уменьшается буферная емкость крови, что, вероятно, могло являться одним из лимитирующих факторов дальнейшего выполнения мышечной нагрузки (рис.3.)

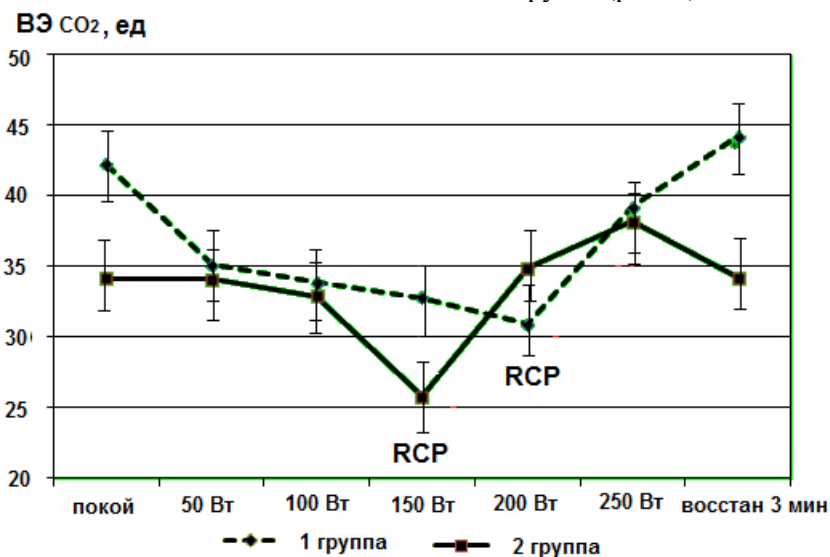


Рис.3. Динамика ВЭСО<sub>2</sub> в группах у спортсменов (1) и студентов (2) 19-20 лет при росте мощности физической нагрузки и при восстановлении  
Примечание: RCP - точка респираторной компенсации

На рисунке 3 видно что в покое ВЭСО<sub>2</sub> у спортсменов выше на 16 % ( $p < 0,05$ ) по сравнению со студентами 2 группы. Этот показатель у студентов начиная с 1 нагрузки падает незначительно, достигает пика снижения при нагрузке мощностью 150 Вт на 51% ( $p < 0,05$ ), а при нагрузке 200 Вт увеличивался на 61 % ( $p < 0,05$ ) относительно предыдущий ступени нагрузочного теста. Такое изменение в динамике указывало на точку респираторной компенсации (RCP) или момент усиления вентиляции по углекислоте (дыхательная компенсация) на фоне непрерывно возрастающей физической нагрузки в ответ на развитие ацидоза в крови, который, в свою очередь, возникает благодаря лимиту возможностей буферных систем крови. Прохождение вентиляторного порога анаэробного обмена (ПАНО) у исследуемых 2 группы сопровождалось ростом напряжения регуляторных механизмов почти в два раза ( $p < 0,05$ ), не снижающегося на последующих нагрузках и в восстановительном периоде. При этом у исследуемых первой группы, которую составили тренированные юноши, прохождение RCP и вентиляторного ПАНО регистрировалось на нагрузке большей мощности 200 Вт. При этом рост регуляторного напряжения по показателю ИН почти в два раза ( $p < 0,05$ ) было зафиксировано только при выполнении нагрузки мощностью 250 Вт. Вероятно оптимальность регуляторного ответа у юношей с большими функциональными ресурсами способствовала осуществлению адекватного

вентиляторного контроля в переходных режимах функционирования, а выявленная корреляционная зависимость между показателями ИН и напряжением CO<sub>2</sub> (R=0,61) в выдыхаемом воздухе на пике регуляторного напряжения (табл.2) подтверждает значимость совершенствования функциональных взаимоотношений в понижении цены и повышении успешности адаптации.

Таким образом, эффективность вентиляторного контроля у юношей 19-20 лет обеспечивается уровнем функциональных резервов, с ростом которых степень выраженности адаптационного напряжения и компенсаторных трат снижается.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

1. Расширение функциональных резервов кардиореспираторной системы у юношей 19-20 лет сопровождалось оптимизацией регуляторных механизмов и характеризовалось низкими значениями ИН при увеличении внешней нагрузки;
2. У исследуемых первой группы, которую составили тренированные юноши, прохождение РСР и вентиляторного ПАНО регистрировалось на нагрузке мощности 200 Вт, а рост регуляторного напряжения почти в два раза ( $p<0,05$ ) по показателю ИН при выполнении нагрузки мощностью 250 Вт;
3. Прохождение РСР и вентиляторного ПАНО у исследуемых 2 группы было выявлено при выполнении нагрузки мощностью 150 Вт и сопровождалось ростом напряжения регуляторных механизмов почти в два раза ( $p<0,05$ ), не снижающегося на последующих нагрузках и в восстановительном периоде;
4. Выявленная корреляционная зависимость между показателями ИН и напряжением CO<sub>2</sub> в выдыхаемом воздухе на пике регуляторного напряжения (R=0,61) подтверждает значимость совершенствования функциональных взаимоотношений в понижении цены и повышении успешности адаптации.

### **Список литературы**

1. Агаджанян Н. А. Проблемы адаптации и учение о здоровье / Н. А. Агаджанян, Р. М. Баевский, А.П. Берсенева – М.: Изд-во РУДН, 2006. –284 с)
2. American Thoracic Society / American College of Chest Physicians ATS/ACCP Statement on Cardiopulmonary Exercise Testing // Clinical Respiratory diseases and Critical Care Medicine. - 2003. - Vol. 167. - P. 211-277.
3. Balady, G.J. Clinicians Guide to Cardiopulmonary Exercise Testing in Adults. A Scientific Statement From the American Heart Association / G.J. Balady, R. Arena, K. Sietsema // Circulation. - 2010. - № 122. - P. 191-225.
4. Standards for the use of cardiopulmonary exercise testing for the functional evaluation of cardiac patients: a report from the Exercise Physiology Section of the European Association for Cardiovascular
5. Prevention and Rehabilitation / A. Mezzania, P. Agostonib, A. Cohen-Solad [et al.] // European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation. - 2009. -№. 16. - P. 249-267.
6. Жилукас Г., Брожайтене Ю. Физиология человека, 2006.-N 4.-С.24-28
7. Balady, G.J. Clinicians Guide to Cardiopulmonary Exercise Testing in Adults. A Scientific Statement From the American Heart Association / G.J. Balady, R. Arena, K. Sietsema // Circulation. - 2010. - № 122. - P. 191-225.

**CHARACTERISTICS VENTILATION CONTROL YOUNG MEN 19-20 YEARS  
WITH DIFFERENT LEVELS FUNCTIONAL RESERVE  
CARDIORESPIRATORY SYSTEM**

*Minina E.N.*

*Tavrida National V.I. Vernadsky University, Simferopol, Russia  
E-mail: cere-el@yandex.ua*

A study of 40 healthy young men 19-20 years with different levels of functional reserves. To achieve the objectives of research carried out in the rest of the cardiorespiratory system, when the load on the 3-minute recovery period. Using simulated ergometer step-increasing workload. Was to reveal that the expansion of the functional reserves of the cardiorespiratory system in young men 19-20 years old accompanied by optimization of regulatory mechanisms and characterized by low values of stress index (SI) with increasing external load. A correlation between the indicators SI and pCO<sub>2</sub> in the exhaled air at the peak of the voltage regulator during the passage of the respiratory compensation point (RCP) and the anaerobic threshold (ANT) - (R = 0,61), which confirmed the importance of improving the functional relationships in lowering prices and increasing success adaptation. We trained young men, passing RCP fan and ANTs recorded on the load capacity of 200 watts. Passage of the RCP fan and ANTs have studied with lower reserves have been identified in the performance of the load capacity of 150 watts, and accompanied by increased tension of regulatory mechanisms under the group of athletes is almost two times (p < 0.01), does not reduce in subsequent loads and for recovery period.

**Keywords:** functional reserves, stress testing, external respiration, respiratory compensation point.

**References**

1. Aghajanian N.A., Baevskii R.M., Berseneva A.P. Problems of adaptation and learning about health. *Publishing House of the People's Friendship University*, 284 (2006).
2. American Thoracic Society. American College of Chest Physicians ATS/ACCP Statement on Cardiopulmonary Exercise Testing. *Clinical Respiratory diseases and Critical Care Medicine*. **167**. 211-277, (2003).
3. Balady G.J., Arena R., Sietsema K. Clinicians Guide to Cardiopulmonary Exercise Testing in Adults. A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*, **122**, 191-225. (2010).
4. Standards for the use of cardiopulmonary exercise testing for the functional evaluation of cardiac patients: a report from the Exercise Physiology Section of the European Association for Cardiovascular
5. Mezzania A., Agostonib P., Cohen-Solad A. [et al.] Prevention and Rehabilitation. *European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation*., **16**, 249-267, (2009).
6. Žiliukas G., Brozhaytene Yu. *Fiziologiya human*, **4**, 24-28, (2006).
7. Balady, G.J., Arena R., Sietsema K. Clinicians Guide to Cardiopulmonary Exercise Testing in Adults. A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*, **122**, 191-225, (2010).

*Поступила в редакцию 09.11.2014 г.*

**УДК 57.045:612.014.41'14**

## **ИЗМЕНЕНИЕ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У ШКОЛЬНИКОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ РАЗЛИЧНОГО АТМОСФЕРНОГО ДАВЛЕНИЯ**

*Панова С.А, Кириллова А.В., Янцев А.В., Нагаева Е.И., Чайка А.В.*

*Таврический национальный университет имени В.И. Вернадского, Симферополь, Россия  
E-mail: kyryllova.alla@mail.ru*

Установлено наличие метеочувствительности у всех групп испытуемых, с наибольшим уровнем достоверности для СД и наименьшим для ЧСС, что свидетельствует о том, что у школьников именно СД является наиболее чувствительным к изменению барометрического давления. Наиболее достоверные отклонения ЧСС, СД и ДД от контроля наблюдаются при высоком уровне барометрического давления. Как следствие, изменение уровня СД при высоком атмосферном давлении можно считать первичным маркером в определении метеочувствительности у школьников.

**Ключевые слова:** метеочувствительность, метеолабильность, метеотропные реакции, дети, школьный возраст, артериальное давление, пульс.

### **ВВЕДЕНИЕ**

В процессе эволюции человек выработал способность приспосабливаться к постоянно меняющимся условиям внешней среды, прежде всего к атмосферным изменениям, определяющим погоду [1]. Погодные факторы действуют на нас разными путями. Через кожу воздействуют температура, влажность, ветер, солнечные лучи, атмосферное электричество, радиоактивность. Через легкие мы воспринимаем температуру воздуха, влажность. Ветер, чистоту воздуха, его ионизацию, свет, шум, запах, температуру, химический состав воздуха мы воспринимаем разными сенсорными системами организма (зрительной, слуховой, тактильной, вкусовой, обонятельной). Реже, особенно у ослабленных лиц, страдающих хроническими заболеваниями, при резких изменениях погоды наряду с расстройствами общего состояния могут появиться признаки обострения болезни. В этом случае можно говорить о том, что у пациента развилась патологическая реакция в ответ на изменения метеорологических условий. Установлено, что метеотропные реакции проявляются внутриклеточными изменениями, что влияет на функции и ультраструктуру клеток [1, 2].

Реактивность организма к погоде традиционно изучается с позиции метеопатологии. Метеопатические реакции и состояния широко распространены и с каждым годом их число растёт [3, 4]. Согласно медицинской статистике, около 75% людей «чувствуют погоду» [5, 6].

На данный момент проявления метеотропных реакций наиболее изучены у людей пожилого и старческого возраста с ярко выраженными патологическими процессами в организме [7–9], чему способствует обилие данных клинической

медицины, а также непосредственное применение на практике результатов исследований. Также были проведены многочисленные эксперименты, которые выявили связь между изменением погодных условий и функционированием здорового организма человека в зрелом возрасте [9]. В последнее время развивается направление по изучению метеочувствительности в период полового созревания организма [10].

Несмотря на достаточно неплохую изученность этого вопроса, учёными и исследователями заметно мало внимания уделялось школьному возрасту, который зачастую характеризуется пограничным, между условно здоровым и патологическим, состоянием организма. Патологические процессы в этот возрастной промежуток нередко возникают на фоне нормального функционирования организма в целом, что объясняется наличием резервов здоровья, которые существенно сокращены в пожилом и старческом возрасте.

Целью настоящего исследования явилось определение влияния метеоусловий как наиболее значимых неэкстремальных экзогенных факторов на физическое здоровье детей школьного возраста.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

1. В исследованиях приняли участие учащиеся 1-х, 3-х, 5-х, 7-х и 9-х классов Симферопольской СОШ №2, в количестве 100 человек (в каждой группе по 10 девочек и 10 мальчиков).
2. Для решения поставленных задач использовали следующие методические приемы: регистрация атмосферного давления, а также – систолического и диастолического артериального давления, и пульса у испытуемых, вычисление ударный объем сердца (УОС), минутный объем крови (МОК), коэффициент экономичности кровообращения (КЭК), индекс Робинсона (ДП), адаптационный потенциал (АП), вегетативный индекс (ВиК) и индекса Руфье.
3. Уровень атмосферного давления определяли согласно барометру, находящемуся в здании Симферопольской СОШ №2. Для проведения исследования было выбрано 3 дня (весна 2014 г.): с высоким ( $\geq 760$  мм.рт.ст.), низким ( $\leq 740$  мм.рт.ст.) и нормальным ( $\sim 750$  мм.рт.ст.) атмосферным давлением для данной местности. В качестве контроля, были использованы данные, полученные при нормальном атмосферном давлении.
4. Регистрация систолического и диастолического артериального давления, а также пульса производилась посредством электронного полуавтоматического сфигмоманометра (тонометра) компании «Microlife». Измерения производились согласно методу Короткова.
5. Результаты подверглись статистической обработке с вычислением средней арифметической ( $x_{cp}$ ) и ошибки средней ( $Sx_{cp}$ ). Достоверность различий и изучение особенностей метеочувствительности учащихся по классам, определялись с помощью модуля «Критерий Стьюдента для связанных выборок» пакета Statistica 10.01 Enterprise, при уровне значимости  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Возрастная динамика статистических характеристик артериального давления и частоты сердечных сокращений (ЧСС) у школьников, в состоянии относительного покоя, представлена в таблице 1.

Таблица 1.

### Возрастная динамика статистических характеристик артериального давления и частоты сердечных сокращений у школьников в состоянии относительного покоя

Класс	$x_{cp} \pm Sx_{cp}$			Атмосферное давление
	ЧСС	Систолическое артериальное давление	Диастолическое артериальное давление	
1	86±1,62*	95±1,95	64±2,14	низкое
	89±2,08	94±2,05	64±1,65	высокое
	93±2,35	100±2,55	67±2,11	нормальное
3	88±2,83	98±2,48	67±2,44	низкое
	86±2,63	94±2,82*	67±2,04	высокое
	82±2,68	103±2,81	65±1,91	нормальное
5	85±2,30	99±1,97	63±1,61	низкое
	84±3,22	97±2,36	69±2,46**	высокое
	85±2,16	96±2,03	59±1,33	нормальное
7	83±3,08	115,±2,26*	67±1,73	низкое
	78±2,90	112±2,85	73±2,60	высокое
	83±2,31	107±1,76	68±1,83	нормальное
9	82±2,78	108±1,58*	69±1,37	низкое
	74±3,03	112±1,97**	69±1,44	высокое
	80±2,61	103±2,27	67±1,99	нормальное

Примечание: Звездочками отмечены достоверные различия по сравнению с контролем (нормальное атмосферное давление), при \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

Школа №2 является специализированной – дети занимаются танцами. Занятия танцами способствуют улучшению периферического кровотока в нижних конечностях за счет ускорения кровообращения что выражается в приросте пульсового кровенаполнения и увеличении скорости кровотока по артериям среднего и малого калибра во всех сегментах; а также умеренном увеличении скорости кровотока по артериям крупного калибра в области голеней. Занятия танцами снижают АП на 0,3-0,4 единицы по сравнению с теми, кто ими не занимается, более того, у них АП к концу учебного года повышается на 0,2-0,3 единицы [11–13].

Возрастная динамика статистических характеристик ударного объема сердца, минутного объема крови, коэффициента экономичности кровообращения, индекса

**ИЗМЕНЕНИЕ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У ШКОЛЬНИКОВ ...**

Робинсона, адаптационного потенциала, вегетативного индекса и индекса Руфье у школьников, в состоянии относительного покоя, представлена в таблице 2.

**Таблица.2.**

**Возрастная динамика показателей функциональных возможностей сердечно-сосудистой системы школьников, в состоянии относительного покоя**

Класс	$\bar{X}_{cp} \pm S_{X_{cp}}$							Индекс Руфье	Атмосферное давление
	УОС	МОК	КЭК	ДП	АП	ВиК			
1	72,90± 1,35	6475± 200	2714± 157	83,54± 2,90	1,70± 0,05	27,60± 2,65	7,59± 0,46	высокое	
	72,67± 1,93	6249± 192	2654± 159	81,99± 2,42*	1,69± 0,05*	24,92± 2,67		низкое	
	71,68± 1,95	6611± 206	3000± 209	92,59± 3,70	1,85± 0,06	26,87± 2,49		нормальное	
3	67,88± 1,5*	5850± 202	2349± 161*	81,79± 3,85	1,64± 0,07	21,62± 2,65	7,58± 0,26	высокое	
	70,50± 2,21	6149± 224	2773± 218	86,93± 4,33	1,71± 0,07	23,82± 2,33		низкое	
	74,69± 2,33	6053± 236	3073± 249	84,03± 3,31	1,70± 0,05	18,67± 3,34		нормальное	
5	66,32± 2,15*** *	5649± 267*	2391± 195**	82,63± 3,76	1,70± 0,06	17,48± 1,33*	7,98± 1,15	высокое	
	73,57± 1,54	6197± 149	2993± 135	83,51± 2,72	1,67± 0,05	25,21± 2,16*		низкое	
	76,26± 1,21	6470± 177	3120± 161	81,68± 2,96	1,61± 0,05	29,60± 2,19		нормальное	
7	67,87± 2,35	5207± 207**	2943± 195	86,34± 3,86	1,88± 0,06	4,15±4 ,47**	8,58± 0,54	высокое	
	76,00± 1,51***	6239± 172	3932± 150**	95,57± 4,15	1,95± 0,06	17,91± 2,48		низкое	
	71,15± 1,64	5835± 130	3196± 130	88,33± 3,45	1,83± 0,06	17,79± 2,00		нормальное	
9	71,42± 1,35	5251± 225	3182± 186	82,61± 4,06	1,81± 0,06	4,21±3 ,98	9,08± 0,67	высокое	
	69,42± 1,66	5633± 186	3160± 149	88,03± 2,73	1,85± 0,04	13,89± 3,53		низкое	
	68,91± 1,68	5513± 211	2894± 169	82,83± 3,48	1,75± 0,06	15,02± 3,39		нормальное	

*Примечание:* Звёздочками отмечены достоверные различия по сравнению с контролем (нормальное атмосферное давление), при \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Не смотря на хорошую физическую подготовку школьников, что подтверждается высоким уровнем адаптационного потенциала (в среднем 1,75-1,77 ед., не зависимо от уровня атмосферного давления) а также индексом Руфье (в среднем 7,5-9 ед.), всё же испытуемые проявляют признаки метеочувствительности: под действием барометрического давления наблюдаются изменения уровня всех основных показателей (частоты сердечного сокращения, систолического артериального давления, диастолического артериального давления, ударного объема сердца, минутного объема крови, коэффициента экономичности кровообращения, индекса Робинсона, адаптационного потенциала, вегетативного индекса); индекс Робинсона (ДП) также указывает на пограничное состояние сердечно-сосудистой системы, между хорошим и удовлетворительным (в среднем 80-85 ед.).

В 1-м классе наиболее показательным является отклонение частоты сердечных сокращений от контроля, при низком уровне атмосферного давления, и составляет 7,53 %. В 3-м классе наиболее показательным является отклонение систолического артериального давления от контроля, при высоком уровне атмосферного давления, и составляет 8,74 %. В 5-м классе наиболее показательным является отклонение между контролем и диастолическим артериальным давлением при высоком уровне атмосферного давления, и составляет 14,50 %. В 7-м классе наиболее показательным является отклонение систолического артериального давления от контроля, при низком уровне атмосферного давления, и составляет 6,96 %. В 9-м классе наиболее показательным является отклонение систолического артериального давления от контроля, при низком и высоком уровне атмосферного давления, что составляет 4,63 и 8,04 % соответственно. Достоверные изменения в величине ударного объема сердца и коэффициента экономичности кровообращения наблюдаются в 3-м, 5-м и 7-м классах; для 3-го и 5-го классов различия достоверны при высоком атмосферном давлении, для 7-го класса – при низком. Достоверные изменения в величине минутного объема крови наблюдаются в 5-м и 7-м классах при высоком атмосферном давлении.

В целом же, наличие метеочувствительности доказано у всех групп испытуемых, с наибольшим уровнем достоверности для систолического артериального давления и наименьшим для частоты сердечного сокращения, что свидетельствует о том, что у школьников именно систолическое артериальное давление является наиболее чувствительным к изменению барометрического давления. Наиболее достоверные отклонения частоты сердечного сокращения, систолического артериального давления и диастолического артериального давления от контроля наблюдаются при высоком уровне барометрического давления. Как следствие, изменение уровня систолического артериального давления при высоком атмосферном давлении можно считать первичным маркером в определении метеочувствительности у школьников.

У девятиклассников, в отличие от других возрастных групп, чувствительность к атмосферному давлению доказана для систолического артериального давления, как при низком, так и при высоком атмосферном давлении, что позволяет говорить об этой группе как наиболее метеочувствительной. Однако, ударный объем сердца,



минутный объем крови и коэффициент экономичности кровообращения наиболее чувствительны к изменению атмосферного давления у пяти- и семиклассников, а не у девятиклассников, как следовало бы ожидать. Поэтому необходимо выделить, как наиболее метеочувствительную, целую возрастную группу с 11 до 15 лет. Повышение уровня метеочувствительности в таком широком возрастном промежутке, вероятнее всего, можно объяснить протеканием процесса полового созревания, который, согласно литературным данным, дестабилизирует адаптационные механизмы.

Необходимо обратить внимание и на то, что выявлена обратная зависимость во влиянии атмосферного давления на ударный объем сердца, минутный объем крови: наиболее высокие значения этих показателей наблюдались при нормальном атмосферном давлении, наиболее низкие – при высоком. Низкие значения этих показателей свидетельствуют о высоких потенциальных возможностях гемоциркуляторного аппарата, т.е. внутренние механизмы адаптации совершают работу против внешних сил. Правильность данного предположения подтверждается тем фактом, что среди 100 испытуемых, при нормальном атмосферном давлении, у 96 преобладала симпатическая регуляция кровообращения, а при высоком уровне атмосферного давления, влияние парасимпатической нервной системы на кровообращение увеличилось: теперь «ваготониками» стали 19 человек, по сравнению с 4, при нормальном и низком уровне атмосферного давления (рис. 1).

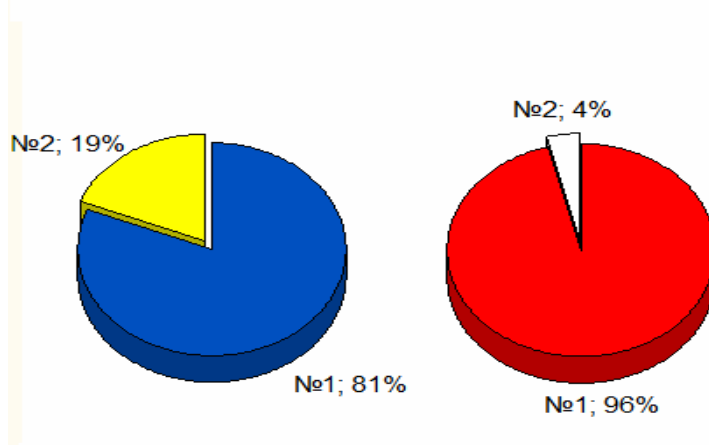


Рис. 1. Влияние атмосферного давления на тип нервной регуляции сердечно-сосудистой системы у школьников Симферопольской СОШ №2.

Слева – высокое атмосферное давление; справа – низкое и нормальное атмосферное давление;

№1 – симпатотоники; №2 – ваготоники

Из всего вышеуказанного можно сделать вывод, что метеочувствительность для школьников является скорее эустрессом, нежели дистрессом.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

1. Наличие метеочувствительности доказано у всех групп испытуемых, с наибольшим уровнем достоверности для систолического артериального давления и наименьшим для частоты сердечных сокращений, что свидетельствует о том, что у школьников именно систолическое артериальное давление является наиболее чувствительным к изменению барометрического давления.
2. Изменение уровня систолического артериального давления при высоком атмосферном давлении можно считать первичным маркером в определении метеочувствительности у школьников.
3. Необходимо выделить как наиболее метеочувствительную целую возрастную группу с 11 до 15 лет. Повышение уровня метеочувствительности в таком широком возрастном промежутке, вероятнее всего, можно объяснить протеканием процесса полового созревания, который, согласно литературным данным, дестабилизирует адаптационные механизмы.
4. Выявлена обратная зависимость во влиянии атмосферного давления на ударный объем сердца и минутный объем крови: наиболее высокие значения этих показателей наблюдались при нормальном атмосферном давлении, наиболее низкие – при высоком. Низкие значения этих показателей свидетельствуют о высоких потенциальных возможностях гемоциркуляторного аппарата, т.е. внутренние механизмы адаптации совершают работу против внешних сил. Значит, метеочувствительность для школьников является скорее эустрессом, нежели дистрессом.

## **Список литературы**

1. Агаджанян Н. А. Человек и биосфера / Агаджанян Н. А. – М.: Знание, 1987. – 96 с.
2. Агаджанян Н. А. Резервы нашего организма / Агаджанян Н. А., Катков А. Ю. – М.: Знание, 1990. – 240 с.
3. Бреус Т. К. Космическая и земная погода и их влияние на здоровье и самочувствие людей / Т.К. Бреус, Р.Р. Назиров // Методы нелинейного анализа в кардиологии и онкологии: Физические подходы и клиническая практика. – 2010. – вып. 2. – С. 99-110
4. Бреус Т.К. Хроноструктура ритмов сердца и факторы внешней среды. Монография / Бреус Т.К. – М.: Российского университета дружбы народов; Полиграф сервис, 2002. – 32 с.
5. Григорьев И. И. Погода и здоровье / Григорьев И. И. – М.: Авиценна, ЮНИТИ, 1996. – 96 с.
6. Дубров А. П. Биологическая геофизика. Поля. Земля. Человек и Космос / Дубров А. П. – М.: Фолиум, 2009. – 176 с.
7. Дубровская С. В. Метеочувствительность и здоровье / Дубровская С.В. – М.: Рипол Классик, 2011. – 256 с.
8. Исследование магнито- и метеочувствительности у студентов / Куликова Н.В., Бурцева Е.В., Низкодубова С. В. [и др.] // Вестник Томского государственного педагогического университета. – 2000. – Серия: Естественные науки (спецвыпуск), №02 (18). – С. 69-70.
9. Коц Я. М. (ред.). Спортивная физиология / Коц Я.М. – М.: Физкультура и спорт, 1986. – 240 с.
10. Непронова О.О. Воздействие метеорологических факторов на функциональное состояние и резервные возможности организма спортсменов препубертатного и пубертатного периодов онтогенеза / Непронова О.О. – Краснодар, 2009. – 151 с.
11. Зенченко Т.А. Характерные типы реакций на действие земной и космической погоды у здоровых людей и больных с артериальной гипертензией / Т.А. Зенченко, А.М. Мерзлый, Т.К. Бреус //

Методы нелинейного анализа в кардиологии и онкологии: Физические подходы и клиническая практика. – 2010. – вып. 2. – С. 141-155

12. Мизун Ю.Г. Космос и здоровье. Как уберечь себя и избежать болезней / Мизун Ю.Г. – М.: Вече, АСТ, 1998. – 368 с.
13. Якунина Е.Н. Особенности адаптации студентов к учебной деятельности при занятиях парным коллективным танцем / Якунина Е.Н. – Томск, 2011. – 238 с.

## **CHANGES IN CARDIOVASCULAR PARAMETERS IN SCHOOL CHILDREN UNDER THE INFLUENCE OF DIFFERENT ATMOSPHERIC PRESSURE**

*Panova S.A., Kirillova A.C., Yantsev A.C., Nagaeva E.I., Chika A.V.*

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

In the process of evolution humans have developed the ability to adapt to constantly changing conditions of the external environment, primarily to atmospheric changes, determining weather [1]. Weather factors influence on us in different ways. Through the skin affected by temperature, the wind, sunlight, atmospheric electricity, radioactivity. Through the lungs we perceive temperature and humidity/ The wind, the purity of the air, its ionization, light, noise, odour, temperature, chemical composition of the air we perceive different sensory systems of the body (visual, auditory, tactile, gustatory, olfactory). Rarely, especially in immunocompromised persons suffering from chronic diseases, sudden weather changes along with disorders General condition may be signs of acute disease. In this case, you can say that the patient has developed a pathological reaction in response to changes in meteorological conditions. The basis of such reactions are intracellular changes influencing the function and ultrastructure of cells [1, 2].

The reactivity of the organism to the weather traditionally studied from the perspective of metiopathology. Meteopatological reactions are widespread and every year their number is increasing [3, 4]. According to medical statistics, about 75% of people "feel the weather" [5, 6].

Now manifestations meteotropic reactions most studied in elderly and senile patients with pronounced pathological processes in the body [7–9], which contributes to the abundance of data in clinical medicine, as well as direct practical application of research results.

Also numerous experiments have been conducted, which revealed the relationship between changing weather conditions and the healthy functioning of the human body in adulthood [9]. Recently developing field of study of metesensitivity in puberty the body [10].

Despite good enough to study this question, scientists and researchers, insufficient attention to school age, which is often characterized by the border between conditionally healthy and pathological state of the organism. Pathological processes in this age period often arise on the background of the normal functioning of the organism as a whole, which is explained by the presence of health reserves, which are significantly reduced in elderly and senile age.

This work was aimed at studying the individual characteristics of *meteo chuvstvenosti* school-aged children through the study of the influence of atmospheric pressure on arterial pressure and heart rate, as well as sexual characteristics *meteosensitivity*.

Established the presence *meteosensitivity* in all groups of subjects with the highest level of reliability for systolic blood pressure and lowest for heart rate. This indicates that school-aged children systolic pressure is the most sensitive to changes in atmospheric pressure. As a result, changes in systolic blood pressure at high atmospheric pressure can be considered as the primary marker in determining *meteosensitivity* schoolchildren. The data obtained are of theoretical value, as deepen the knowledge about the influence of weather conditions as the most important non-extremal exogenous factors on physical health of children of school age.

**Keywords:** *meteosensitivity, meteolability, metotropnye reaction, children, school age, blood pressure, pulse.*

#### References

1. Aghajanian N.A. Man and the biosphere (M.: Knowledge, 1987), 96 p.
2. Aghajanian N.A. the Provisions of our body (M.: Knowledge, 1990), 240 p.
3. Breus because of Space and terrestrial weather and their impact on health and wellbeing of people. Methods of nonlinear analysis in cardiology and Oncology: Physical approaches and clinical practice, 2, 89 (2010)
4. Breus because Chronocrators rhythms of the heart and environmental factors. Monograph (M.: Russian University of friendship of peoples; Polygraph service, 2002), 32 p.
5. I. Grigoriev I. Weather and health (M.: Avicenna, UNITY, 1996), 96 p.
6. Dubrov, A.P. Biological Geophysics. Field. Earth. Man and the Cosmos (M.: Folium, 2009), 176 p.
7. Dubrovskaya S.C. *Meteosensitivity and health* (M.: reepol classic, 2011), 256 p.
8. The Study of magneto - and *meteo chuvstvenosti* students. Bulletin of the Tomsk state pedagogical University. Series: Natural science (special issue), 02(18), (2000), 69 p.
9. Kots J. M. (editor). Sports physiology (M.: Physical culture and sport, 1986), 240 p.
10. Neronova s.r.o Impact of meteorological factors on functional status and reserve capacity of the organism athletes prepubertal and pubertal periods of ontogenesis (Krasnodar, 2009), 151 p.

*Поступила в редакцию 22.10.2014 г.*

**UDK 543.544.5.068.7: 577.114.083:616-006.432**

## **URINARY FREE OLIGOSACCHARIDES OF PATIENTS WITH LEUKAEMIA**

*Pismenetskaya I.U.<sup>1</sup>, Kolyhalova S.U.<sup>2</sup>, Butters T.D.<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>*SI “Dnepropetrovsk Medical Academy”, Dnepropetrovsk, Ukraine*

<sup>2</sup>*SI “Specialized Medical Unit 6”, Dnepropetrovsk, Ukraine*

<sup>3</sup>*Oxford Glycobiology Institute, University of Oxford, Oxford, UK*

*E-mail: ip01589@gmail.com*

Free oligosaccharides (FOS) in urine of patients with different types of leukaemia and those of practically healthy people were studied using high-performance liquid chromatography (HPLC) after anthranilic acid labelling to evaluate the potential of these compounds for diagnostics and therapy monitoring. The labelled sugars were separated into neutral and charged oligosaccharides with QAE Sephadex (Q25-120) chromatography. The FOS profiles of normal urine were not identical in different samples, but all the samples had some common features. Urine FOS of the patients showed individual profiles containing different amounts of FOS species and were completely distinguished from those in normal urine. This individuality was provided mostly due to neutral species as HPLC profiles of charged FOS were almost identical among the samples.

**Keywords:** free oligosaccharides, HPLC-profiles of glycans, urine, leukaemia.

### **INTRODUCTION**

The analysis of glycan structural alterations in glycoconjugates is becoming increasingly important in respect to search of new biomarkers in cancer, quality control of cancer therapy, and the development of new drugs and could be used in addition to genetic, gene expression and proteomic analyses. The observed alterations in glycosylation in cancer have led to clinical trials in which glycans on cancer cell-surface proteins are targeted. These new approaches to cancer treatment include immunotherapy and carbohydrate-processing inhibitor-based strategies. Compounds that mimic glycans involved in the metastatic dissemination of cancer are also actively sought. These glycodynamic approaches are contributing to our increased understanding of the underlying biology that is responsible for the development, progression and metastasis of cancer [1].

Cancer-associated alterations of glycan in glycoconjugates or in their products of degradation have been found on the cell surface, in serum proteins and in urine components. New cancer glyco-biomarkers or anticancer drug targets are being sought mostly among glycoproteins or proteoglycans and although cytosol free oligosaccharides in different cells are under intensive investigations [2,3,4] detailed analyses of their structures neither in serum nor in urine and their relevance to cancer alterations have not yet been carried out. Moreover, among all free N-glycans only high mannose-type is being studied so far and little is known about complex-type glycans in cell cytosol or in any biological liquid. At the same time even one of the first look at free oligosaccharides of

this type [5] allowed to find differences in some cells among the various cancer cell lines and to show a new direction for seeking of specific biomarkers for differentiated diagnostics, individual control and treatment.

As urinary samples can be collected in large amounts in a non-invasive fashion and they are the sources of informative compounds [6, 7], usage of urine has obvious advantages compared to serum or tissue. It means that any time it is possible to obtain enough amounts of samples without any disturbance of the patient that is vitally important in cases of cancer. That is why a detailed investigation of free oligosaccharides in urine must be promising addition to cancer glyco-biomarkers obtained so far [8].

The main objective of this investigation was studying of free oligosaccharides in urine of patients with different types of leukemia to estimate prospects of their clinical and therapeutic usage.

#### **MATERIALS AND METHODS**

Urine samples (n=35) of patients with erythremia, subleukemic myelosis, hypoplastic anaemia, myelodysplastic syndrome with transformation, acute lymphatic leukaemia and acute myelomonocytic leukaemia were collected in SI "Dnepropetrovsk Medical Academy". The urine samples of practically healthy volunteers (n=20) were obtained in the Glycobiology Institute of Oxford University and in Dnepropetrovsk clinics. The samples were collected in accordance with the requirements of the Ethics Committees.

Partial sterilization and stabilization of urine with sodium aside (0.01%) were used for shipping and storage.

Protocols for preliminary purification of free glycans from urine were published by Alonzi D.S. et.al. [9] and were developed during further studies. The purification comprised filtration through a syringe with Millex-LH, 0.45  $\mu\text{m}$ , filter (Millipore Corp., USA) to take proteins away and porous graphitized carbon column (PGC from Thermo Electron, Runcorn, UK) chromatography to remove glucose.

Free oligosaccharides were analysed using high-performance liquid chromatography (HPLC) after anthranilic acid (2-AA) labelling [10, 11].

Free carbohydrates were labelled with 2-AA as described by Neville D.C.A. et.al. [10] with some modifications. For purification after 2-AA labelling the columns Spe-ed SPE Cartridges Amide-2, (Applied Separations, USA) were used after pre-equilibration with 1ml acetonitrile, 1ml H<sub>2</sub>O, 1ml acetonitrile. Samples were loaded in the mixture of acetonitrile and water (97:3 v/v). The columns were washed with the mixture of acetonitrile and water (95:5 v/v) and the labelled oligosaccharides were eluted with 1.5ml water and separated by normal-phase HPLC (Water, UK) using a 4.6x250-mm TSK gel-Amide 80 column (Anachem, Luton, Beds, UK).

For more detailed studies 2-AA – labelled sugars were separated into neutral and charged oligosaccharides with QAE Sephadex (Q25-120) chromatography by eluting the neutral FOS with 0.5M acetic acid and the charged FOS with 0.5 ammonium acetate [11].

Glucose unit (GU) values were determined following comparison with a 2-AA-labelled glucose oligomer ladder derived from a partial hydrolysate of dextran as an external standard [10].

The data were collected and processed using Empower software, Waters Millennium, Waters Empower, Peak Time, Microsoft Office Excel 2003/2007, Microsoft Power Point 2003/2007.

**RESULTS AND DISCUSSION**

The concentration of urinary free oligosaccharides in the samples studied (Figure 1) varied over a wide range – from about 14000 pkmol/ml to about 90000 pkmol/ml – with the mean value  $41410.71 \pm 3363.253$  pkmol/ml and was significantly different ( $p > 0.01$ ) from that in the control group. All the samples of the patients could be subdivided into two groups ( $p > 0.05$ ): with a higher concentration ( $65871.85 \pm 3333.05$  pkmol/ml) and with a lower one ( $30708.96 \pm 1826.65$  pkmol/ml). The control samples also included two groups with different ( $p > 0.05$ ) concentrations of free oligosaccharides ( $37901.09 \pm 2846.16$  pkmol/ml and  $16466.3 \pm 1085.28$  pkmol/ml) and the total mean value  $23968.47 \pm 2658.67$  pkmol/ml. In both cases the group with the higher concentration comprised about 30% of the samples.

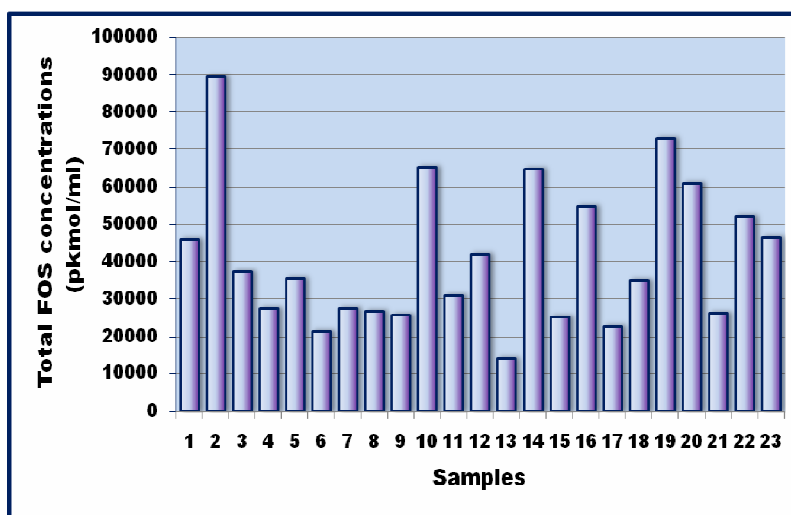


Fig.1. Total concentration of urinary free oligosaccharides of patients with leukaemia.

We were interested to analyze urinary free oligosaccharides consisting of 4 and more monosaccharide residues, therefore subjected to analysis of the chromatograms in the correspondent time interval from 20 to 44 min. HPLC chromatograms of the urine samples of practically healthy volunteers were not absolutely identical but similar enough to be used as control profiles. Chromatographic profiles of the patients’ urinary free oligosaccharides were patient-specific with the most similar segment in the time interval from 26 to 44 min (Fig.2).

To simplify the comparison and analysis of the chromatograms we used two reference chromatographic peaks representing in the control profiles (Fig.2 A) as the main ones. The

position of the first of them corresponded to  $5.87 \pm 0.07$ GU (Fig.2C), the position of the second correlated with  $8.76 \pm 0.05$ GU (Fig.2D). It means that the oligosaccharides in the first peak consist of 5-6 monosaccharide residues and those in the second peak comprise 8-9 monomer residues. In the figure 2 the positions of the reference peaks are shown by broken lines.

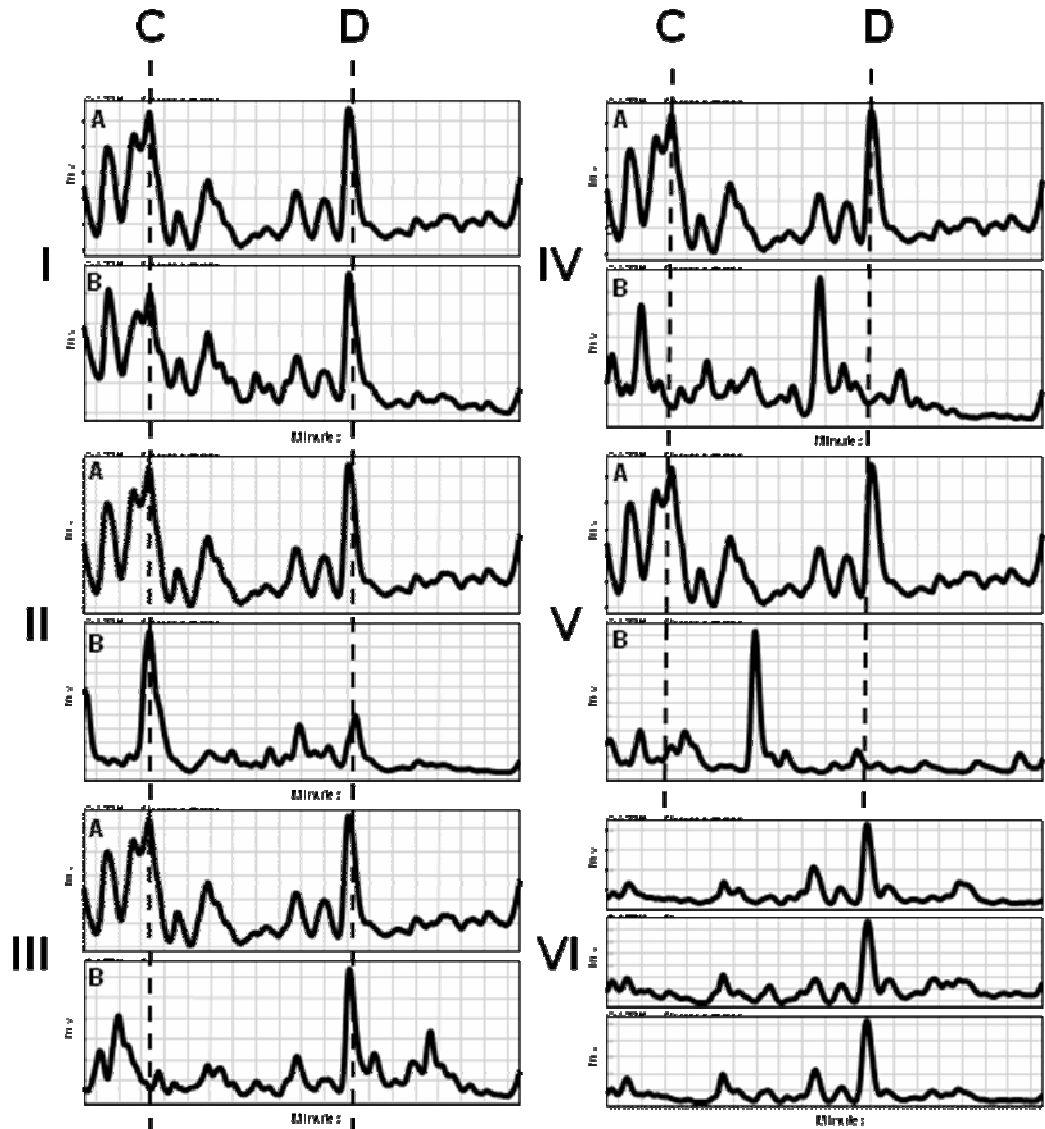


Fig.2. HPLC-profiles of urinary free oligosaccharides of patients with leukaemia. A – control; B – sample; C, D – position of the main reference chromatographic peaks; I, II, III, IV,V – HPLC-profiles of the total FOS in different samples; VI – HPLC-profiles of the charged FOS in different samples.



According to the structure of the HPLC-profiles in the mentioned interval all the samples can be divided into 5 groups (Fig.2. I, II, III, IV, V). Most of the samples were in the first group (Fig.2. I) with the chromatograms almost identical to the control in this interval. In the samples of groups II and III the first or the second reference peak was decreased. In some samples the reference peaks were not represented and a different main peak appeared in a different position (Fig.2. IV,V). Any correlation with a particular type of leukaemia was not found.

The separation of the urinary free oligosaccharides into neutral and charged fractions revealed that individual special characteristics of the HPLC-profiles were determined by the neutral fractions of the samples. The charged fractions were almost identical in all the samples (Fig.2.VI), included the only main peak with  $8.76 \pm 0.05$ GU and a lot of minor species in the time interval from 26 to 44 min. This abundance of the minor peaks distinguished the charged fractions of the patients' urinary free oligosaccharides from the control.

### **CONCLUSIONS**

1. It was the first time HPLC spectra of urinary free oligosaccharides of patients with different types of leukaemia were obtained and compared with glycans spectra of practically healthy donors.
2. It was shown that HPLC-profiles of total fractions were patient-specific rather than disease-specific.
3. The neutral fractions of the samples comprised of the most species of the total fractions and determined HPLC-profiles' individuality.
4. The charged fractions of urinary free oligosaccharides of patients with different types of leukaemia were very similar and differentiated the patients' samples from those of practically healthy volunteers.
5. Analysis of urinary free oligosaccharides can be promising for searching of new cancer biomarkers.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

The urine samples of patients were kindly provided for the analysis by a physician of PI "City Multidisciplinary Clinics" T.P.Nikolaenko-Kamyshova.

This part of the research has been done in the Oxford Glycobiology Institute (University of Oxford, UK) with support by the EMBO grant (ASTF 209-2007) and the grant of the International Union Against Cancer (ICR/09/044).

### **References**

1. Dwek R. A., Hamid U. M. A., Llorens R. D., Peracaula R., Radcliffe C. M., Robertson J., Royle L., Rudd P. M. and Zitzmann N., Glycosylation markers for cancer diagnosing and monitoring, *Patent US2006269974 USA, G01N33/574/ -№ US20060411246 20060426. Application 26.04.05. Published 30.11. (2006).*

2. Arnold J.N., Saldova R., Galligan M.C., Murphy T.B., Mimura-Kimura Y., Telford J.E., Godwin A.K. and Rudd P.M., Novel glycan biomarkers for the detection of lung cancer, *J Proteome Res.*, **10** (4), 1755 (2011).
3. Kanta Y., Shunji N., and Sumihiro H., Structural diversity of cytosolic free oligosaccharides in the human hepatoma cell line, HepG2, *Glycobiology*, **16** (4), 294(2006).
4. Brooks S.A., Carter T.M., Royle L., Harvey D.J., Fry S.A., Kinch C., Dwek R.A. and Rudd P.M., Altered glycosylation of proteins in cancer: what is the potential for new anti-tumour strategies, *Anticancer Agents Med Chem.*, **8**(1), 2 (2008)
5. Ishizuka A, Hashimoto Y, Naka R, Kinoshita M, Kakehi K, Seino J, Funakoshi Y, Suzuki T, Kameyama A. and Narimatsu H., Accumulation of free complex-type N-glycans in MKN7 and MKN45 stomach cancer cells, *Biochem.J.*, **413** (2), 227 (2008).
6. Xia B., Asif G., Arthur L., Pervaiz M.A., Li X., Liu R., Cummings R.D. and He M., Oligosaccharide analysis in urine by maldi-tof mass spectrometry for the diagnosis of lysosomal storage diseases, *Clinical Chemistry*, **59**, 9, 1357 (2013).
7. Bruggink C., Poorthuis B.J., Deelder A.M., Wuhler M. Analysis of urinary oligosaccharides in lysosomal storage disorders by capillary high-performance anion-exchange chromatography-mass spectrometry, *Anal Bioanal Chem.*, **403**(6),1671(2012).
8. Alonzi D.S., Su Y.H. and Butters T.D., Urinary glycan markers for disease, *Biochem Soc Trans.*, **39**(1), 393(2011).
9. 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).
10. 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).
11. 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).

**Письменецкая И.Ю. Свободные олигосахариды мочи больных лейкемией / И.Ю. Письменецкая, С.Ю. Колыхалова, Т.Д. Баттерс // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2014. – Т. 27 (66), №4. – С.69-74.**

Для оценки перспективности использования в диагностике и мониторинге лечения различных видов лейкемий свободные олигосахариды (СО) мочи больных и здоровых волонтеров были исследованы высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) после маркирования гликанов антраниловой кислотой. Маркированные гликаны разделяли на фракции нейтральных и заряженных олигосахаридов хроматографией на QAE- Сефадексе (Q25-120). Спектры СО в норме не были полностью идентичны, но обладали характерными общими чертами. Спектры СО мочи больных были индивидуальны, состояли из разного количества пиков и полностью отличались от нормы. Эта индивидуальность связана, в основном, с разнообразием нейтральной фракции, так как ВЭЖХ-спектры заряженных СО были почти идентичны в различных образцах.

**Ключевые слова:** свободные олигосахариды, ВЭЖХ-спектры гликанов, моча, лейкемия.

*Поступила в редакцию 10.11.2014 г.*

**УДК 591.044 : 615.849.11**

## **ЭКЗОГЕННЫЙ МЕЛАТОНИН ВЛИЯЕТ НА ПОЛОВОЕ ПОВЕДЕНИЕ КРЫС – САМЦОВ, НАХОДЯЩИХСЯ В УСЛОВИЯХ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ЭКРАНИРОВАНИЯ**

*Темурьянц Н.А., Туманянц К.Н., Ярмолюк Н.С., Хусаинов Д.Р., Черетаев И.В.,  
Чайка А.В.*

*Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Россия  
E-mail: timur328@gmail.com*

Электромагнитное экранирование угнетает половое поведение крыс – самцов. Снижение половой активности крыс сопровождается уменьшением выраженности ритмической составляющей в десятисуточной динамике полового поведения. Ежедневное введение животным мелатонина в дозе 5 мг/кг приводит к фазным изменениям полового поведения: его возрастание на 1 сутки сменяется значительным угнетением, наиболее выраженном на 8-10 сутки эксперимента. Делается вывод о том, что при электромагнитном экранировании имеют место фазные изменения секреции мелатонина.  
**Ключевые слова:** мелатонин, половое поведение, электромагнитное экранирование, самцы крыс.

### **ВВЕДЕНИЕ**

Многолетние исследования лаборатории электромагнитобиологии Таврического национального университета имени В.И. Вернадского показали, что электромагнитное экранирование (ЭМЭ) вызывает выраженные изменения функционального состояния беспозвоночных и позвоночных животных [1].

В этих условиях обнаружены выраженные изменения регенерации планарий *Dugesia tigrina* [2], ноцицепции моллюсков *Helix albescens* [3]. У позвоночных – крыс и мышей - зарегистрированы значительные перестройки поведенческих реакций. Так, при одновременном умеренном снижении постоянной и переменной компонент геомагнитного поля зарегистрировано возрастание межвидовой агрессивности [4], изменения поведения в тесте Порсолта [5]. Развивая представления о влиянии ЭМЭ на поведенческие реакции мы поставили перед собой задачу изучить изменения полового поведения крыс в этих условиях.

Известно, что поведение животных является удобным объектом для изучения механизмов действия экологических факторов. Согласно современным представлениям в механизмах действия электромагнитных факторов важное значение имеет мелатонин (МТ), принимающий участие и в регуляции полового поведения [6-11]. В связи с этим нами предпринято изучение его роли в экранируемых изменениях полового поведения крыс – самцов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на 60 белых беспородных крысах – самцах 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) [12].

В первой серии экспериментов самцов крыс делили на две группы. Крыс каждой группы помещали в ящики размером 790x450x390 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 самцов) помещались в экранирующую камеру ежедневно с 15.00 до 10.00 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 ящиков измерялась с помощью люксметра ТКЛ-ПКМ (модель 63). Внутри ящиков 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.

Для изучения роли МТ в изменении полового поведения использовали способ его введения экспериментальным животным, который успешно используется для коррекции состояний, сопровождающихся снижением секреции нейрогармона [13-16]. В этой серии 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 ( $n=10$ ) раствор (МТ) в дозе 5 мкг/кг в 0,2 мл физ. раствора.

Ежедневно с 10 до 15 час животных обеих групп извлекали из ящиков для тестирования и уборки. Оценивалась их половое поведение, для чего использовались клетки с тремя отсеками, разделенными решетчатыми перегородками, позволяющими крысам, помещенным в них, осуществлять только визуальный контакт. В течение пяти минут регистрировали число подходов самца, помещенного в средний отсек, к отсеку, в котором сидела самка, а также время (с) его пребывания около перегородки. Кроме того, регистрировали время, проведенное самцом около перегородки с отсеком, в котором находился самец, а также около перегородки с пустым отсеком. Во всех экспериментах пользовалась одна самка, что исключало влияние на половое поведение самцов фазы экстрального цикла самки.

Экранирующая камера изготовлена из двухслойного железа «Динамо». Ее устройство и экранирующие свойства описаны ранее [1, 17].

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 свидетельствуют о том, что интактные крысы самцы активно реагируют на самку: они достаточно большое время пребывают у перегородки с отсеком, в котором сидела самка. В отдельные дни эксперимента этот показатель достигал значений 40-50 сек. В десятисуточной динамике времени пребывания самца у перегородки отчетливо проявляется ритмическая составляющая с высокой амплитудой.

Уже односуточное пребывание крыс в экранирующей камере приводит к значительному снижению времени пребывания самца у перегородки с отсеком, в котором сидела самка, а также числа подходов к ней. Наиболее выражено снижение этих показателей на 1-2 сутки эксперимента, когда время пребывания самца у перегородки с самкой снизилось до 41,6 и 33,4 % относительно данных контрольной группы животных. В дальнейшие сроки эксперимента (3-8 сутки) регистрируется менее выраженное уменьшение этих показателей - на 30-40 % относительно данных контрольной группы животных. Однако на 9-10 сутки отмечено усиление эффекта экранирования (рис. 1).

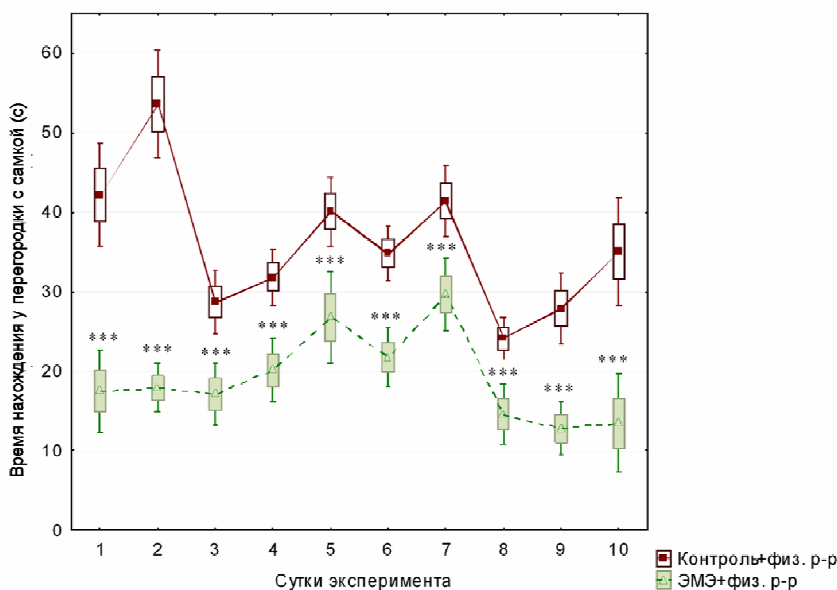


Рис. 1. Динамика полового поведения интактных крыс-самцов, а также животных, подвергнувшихся электромагнитному экранированию.

Примечание: звёздочками отмечены достоверные отличия при  $***p < 0,001$  относительно контроля.

Таким образом, пребывание самцов – крыс в условиях экранирующей камеры приводит к выраженному угнетению полового поведения. Этот вывод подтверждается и анализом данных контрольных экспериментов, в которых регистрировалась реакция самцов на «пустой» отсек. В этом эксперименте изменений исследованных показателей не обнаружено. В то же время при проведении контрольных экспериментов по схеме самец – самец выявлено возрастание числа подходов и времени пребывания животных у перегородки. Такое явление объясняется тем, что в этой схеме проявляется не половое, а внутривидовое агрессивное поведение [17], которое всегда возрастает в условиях ослабленного геомагнитного поля [18, 19].

Обращает на себя внимание и изменение динамики этих показателей – ритмическая составляющая выражена гораздо меньше, кривая сглаживается. Это может свидетельствовать о развитии в условиях экранирования нарушений временной организации репродуктивной системы в целом, в структуре которой половое поведение занимает важное место. Развитие десинхроноза при экранировании описано многими авторами [1, 20, 21].

Таким образом, результаты проведенного исследования следует расценить как изменения функционального состояния репродуктивной системы в условиях экранирования.

Этот вывод косвенно подтверждается и многочисленными данными о влиянии факторов электромагнитной природы на процессы роста и развития [22,23].

Ежедневное введение экспериментальным животным МТ в дозе 5 мг/кг изменяло динамику показателей полового поведения (рис. 2). Уже на первые сутки наблюдений отмечена тенденция к возрастанию показателей половой активности самцов, а на 2 сутки она возросла до 185 % относительно данных крыс, находящихся в условиях ЭМЭ без введения МТ. С 3 по 7 сутки эксперимента отмечено снижение времени пребывания самцов у перегородки с отсеком, в котором находилась самка на 30-55 %, а на 8 сутки зарегистрировано еще более значительное его снижение до 17,1 % относительно сравниваемых групп с тенденцией к дальнейшему возрастанию этого показателя. Необходимо подчеркнуть, что снижение этого показателя относительно на 3-7 суток относительно 3 суток эксперимента статистически значимо ( $p < 0,01$ ). Таким образом, введение животным МТ, находившимся в условиях ЭМЭ, вызывает фазные изменения полового поведения: 1-2 сутки характеризуются возрастанием половой активности, на 3-7 сутки эксперимента регистрируется ее снижение с последующим усилением угнетающего эффекта ЭМЭ на 8-10 сутки опыта.

Полученные данные об изменении полового поведения у крыс при введении МТ соответствуют данным о физиологии этого нейrogормона. Известно, что МТ вовлечен в регуляцию разнообразных физиологических процессов. Мелатониновые рецепторы МТ1 и МТ2 широко распространены, они обнаружены в том числе во всех структурах гипоталама-гипофизарно-гонадной оси. Этот гормон участвует в регуляции секреции гонадотропин-релизинг фактора (ГТРФ). При повышенной секреции мелатонина секреция этого фактора тормозится, что влечет за собой снижение активности всех составных частей гипоталама-гипофизарно-гонадной

оси, уменьшение секреции половых гормонов и как следствие угнетения полового поведения. Следовательно, изменения полового поведения, обнаруженного в настоящем исследовании, может быть связано с влиянием МТ на секрецию половых гормонов [24].

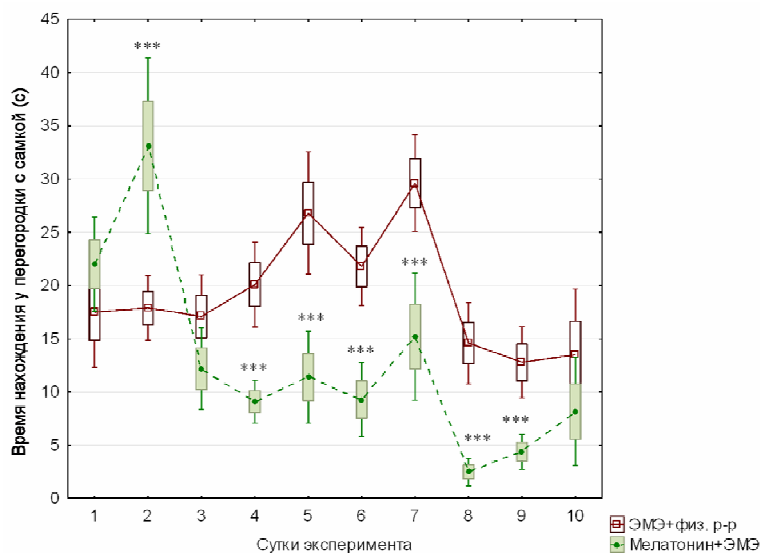


Рис. 2. Динамика полового поведения крыс-самцов, подвергшихся электромагнитному экранированию (ЭМЭ), при введении физ. раствора и мелатонина.

Примечание: звёздочками отмечены достоверные отличия при  $***p < 0,001$  относительно ЭМЭ.

Полученные данные соответствуют мелатониновой теории действия электромагнитных факторов. При начальном угнетении секреции МТ при электромагнитном экранировании его тормозное влияния на выработку ГТРФ снижается, что и проявляется в активации полового поведения на 2 сутки эксперимента.

При дальнейшем действии электромагнитного фактора секреция МТ усиливается, что вызывает снижение синтеза ГТРФ, угнетение полового поведения, что прогрессирует по мере увеличения продолжительности воздействия и по-видимому, возрастанием секреции МТ.

Таким образом результаты проведенного исследования свидетельствуют о важной роли МТ в механизмах изменения полового поведения при электромагнитном экранировании.

Дальнейшее исследования позволят выявить участие и других нейрохимических систем в изменении поведения животных в условиях электромагнитного экранирования. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 14-44-01617 (проект «Механизмы изменения поведения крыс в условиях умеренного электромагнитного экранирования»).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. При десятисуточном электромагнитном экранировании наблюдается угнетение полового поведения крыс – самцов, о чем свидетельствует снижение времени, проведенного самцами у перегородки с отсеком, в котором находилась самка и числа подходов к перегородке. Снижение половой активности крыс самцов в условиях ЭМЭ сопровождается уменьшением выраженности ритмической составляющей в десятисуточный динамике полового поведения.
2. Введение крысам - самцам, находящихся в условиях ЭМЭ, экзогенного МТ приводит к фазным изменениям полового поведения. На 1 сутки воздействия половое поведение стимулируется, о чем свидетельствует возрастание времени, проведенного животными у перегородки и числа подходов к ней. В последующие сроки 2-7 сутки наблюдается угнетение полового поведения, более значительно выраженное на 8-10 сутки эксперимента.

## Список литературы

1. Эффекты слабых электромагнитных воздействий у беспозвоночных животных (регенерация планарий, ноцицепция моллюсков) : монография / Н.А. Темурьянц, Е.Н. Чуян, А.С. Костюк [и др.] – Симферополь: ДИАИПИ, 2012. – 303 с.
2. Темурьянц Н.А. Сезонные различия регенерации планарий в условиях многодневного электромагнитного экранирования / Н.А. Темурьянц, Н.А. Демцун // Биофизика. – 2010. – Т. 55, №4. – С. 710 – 714.
3. Костюк А.С. Ноцицепция моллюсков *Helix albescens* в экране (электромагнитное экранирование) : монография / А.С. Костюк, Н.А. Темурьянц – Saarbrucken (Germany) : LAP Lambert Academic Publishing, 2012. – 181 с.
4. Участие опиоидной системы в изменении агрессивного поведения крыс в условиях длительного электромагнитного экранирования / Н.А. Темурьянц, К.Н. Туманянц, А.С. Костюк и др. // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2014. – Т. 27 (66), №3. – С. 160-168.
5. Влияние длительного электромагнитного экранирования на поведенческие реакции крыс / А.С. Костюк, Н.С. Ярмолук, К.Н. Туманянц, А.В. Лебедев // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2013. – Т. 26 (65), №2. – С.75-81.
6. 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.
7. 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 Hirnforsh. - 1985. – Vol. 26. - P. 471.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Европейская Конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 г.), гл. III, ст. 6.



13. 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.
14. 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.
15. Анисимов В.Н. Эпифиз, мелатонин, старение / В.Н. Анисимов // *Хронобиология и хрономедицина. Руководство.* М.: ООО Медицинское информационное агенство. - 2012. - С. 284-333.
16. 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.
17. Кудрявцева Н.Н. Применение теста «перегородка» в поведенческих и фармакологических экспериментах / Н.Н. Кудрявцева // *Российский физиологический журнал.* - 2002. - N 1. - С.90-105.
18. Девицин Д.В. Динамика физиологических характеристик и эмоционально-поведенческой реактивности животных в преформированной геомагнитной среде / Д.В. Девицин, Н.А. Пальчикова, А.В. Трофимов [и др.] // *Бюллетень СО РАМН.* - 2005. - № 3. - С. 71-77.
19. 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.
20. Бородин Ю.И. Реакция циркадианных ритмов лимфоидной системы на глубокое экранирование от геомагнитного поля Земли / Ю.И. Бородин, А.Ю. Летагин // *Бюллетень экологической биологии и медицины.* - 1990. - № 2. - С. 191-193.
21. Wever R.A. Human circadian rhythms under the influence of weak electric fields and the different aspects of these studies / R.A. Wever // *Int. J. Biometeorol.* - 1973. - Vol. 17 (3). - P. 227-232.
22. Levin M. Bioelectromagnetics in Morphogenesis / M. Levin // *Bioelectromagnetics.* - 2003. - Vol. 24. - P. 295-315.
23. Heynick L. N. Radiofrequency Fields and Teratogenesis / L.N. Heynick and J.H. Merritt // *Bioelectromagnetics Supplement.* - 2003. - Vol. 6. - P. S174-S186.
24. Reiter R.J. Mechanisms of control of reproductive physiology by the pineal gland and its hormones / R.J. Reiter // *Adv. Pineal Res.* - 1987. - Vol. 2. - P. 109-125.

## EXOGENOUS MELATONIN EFFECT ON SEX BEHAVIOR OF MALE RATS UNDER ELECTROMAGNETIC SHIELDING

*Temuryants N.A., Tumanyants K.N., Yarmolyuk N.S., Khusainov D.R., Cheretaev I.V., Chajka A.V.*

*Taurida National V.I. Vernadsky University, Simferopol, Crimea, Russia  
E-mail: timur328@gmail.com*

To study the role of the melatonin in the mechanisms of sex behavior of male rats under electromagnetic shielding (EMS) each group (control and experimental) were divided into 2 subgroups. Rats subgroup I (n=10) daily for 10 days were administrated with 0.2 ml of saline (i.p.), animals second subgroup (n=10) – melatonin at a dose of 5 mg / kg dissolved in saline. Sex behavior was assessed in the test "response to female." To do this, for 5 minutes each male rat was determined by contact with the intact female through the lattice barrier.

The results showed that during the 10-days EMS observed the inhibition of sex behavior of male rats, as evidenced by the reduction of time spent by males in partitions with a compartment, in which there was a female. Decrease in sex activity of male under

EMS accompanied by a decrease in the severity of rhythmic components in 10-days dynamics of sexual behavior.

Exogenous melatonin leads to phase changes in sex behavior of male rats under EMS. Exogenous melatonin has a stimulating effect on the sex behavior of male rats, as evidenced by the increase in the time spent by the animals at the lattice barrier. For 2-7 days observed the inhibition of sex behavior more significantly expressed at 8-10 days of experiment.

Thus the results of the study indicate the important role of melatonin in the mechanisms of sex behavior in male rats under EMS.

**Keywords:** melatonin, sex behavior, electromagnetic shielding, male rats.

### References

1. Temuryants N.A., Chuyan E.N., Kostyuk A.S., Tumanlyants 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. Temuryants N.A., Seasonal differences in the conditions of planarian regeneration electromagnetic shielding multi-day, *Biophysics*, 55(4), 710, (2010).
3. Kostyuk AS Nociception shellfish *Helix albescens* in the screen (electromagnetic shielding), Monograph, (Saarbrücken (Germany): LAP Lambert Academic Publishing, 2012).
4. Temuryants N.A., Kostyuk A.S., Tumanlyants K.N., The effect of melatonin and variable magnetic field of extremely low frequency to development of shielding-induced changes of nociception in snails, *Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry*, 27(66), 3, 151, (2014).
5. Influence of long electromagnetic shielding on the behavioral responses of rats / A.S. Kostyuk, N.S. Yarmolyuk, K.N. Tumanlyants, A.V. Lebedev // Scientific notes of Taurida National University. VI Vernadsky. Series «Biology, chemistry», 26 (65), 2, 75, (2013).
6. Semm P., Schneider T., Vollrath L., Effects of Earth-strength magnetic field on electrical activity of pineal cells, *Nature*, 288, 607 (1980).
7. 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).
8. 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).
9. 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).
10. 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).
11. 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).
12. The European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes, Strasbourg, March 18, 3(6), (1986).
13. 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).
14. 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).
15. Anisimov V.N., pineal melatonin, aging, Chronobiology and chronomedicine. Guide. M.: Ltd. *Medical News Agency*, 284 (2012).
16. 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).

17. Kudryavtseva N.N., Application test "partition" in the behavioral and pharmacological experiments, *Russian physiological magazine*, 1, 90, (2002).
18. 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, *Bulletin SB RAMS*, 3, 71, (2005).
19. 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).
20. Borodin Y., The reaction of the lymphoid system of circadian rhythms on a deep screening of the Earth's geomagnetic field, *Bulletin of Environmental Biology and Medicine*, 2, 191, (1990).
21. Wever R.A., Human circadian rhythms under the influence of weak electric fields and the different aspects of these studies, *Int. J. Biometeorol*, 17 (3), 227, (1973).
22. Levin M., Bioelectromagnetics in Morphogenesis, *Bioelectromagnetics*, 24, 295, (2003).
23. Heynick L.N. Merritt J.H., Radiofrequency Fields and Teratogenesis, *Bioelectromagnetics*, Supplement, 6, S174, (2003).
24. Reiter R.J. Mechanisms of control of reproductive physiology by the pineal gland and its hormones. *Adv. Pineal Res*, 2, 109, (1987).

*Поступила в редакцию 14.11.2014 г.*

**УДК 577.3:57.086.8**

## **ДИЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ ПРОНИЦАЕМОСТЬ И ПОВЕРХНОСТНОЕ НАТЯЖЕНИЕ В ОЦЕНКЕ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ**

*Хмель Н.В.*

*Институт радиофизики и электроники им. А.Я. Усикова НАН Украины.  
E-mail: dreval@ire.kharkov.ua*

Проведено исследование диэлектрической проницаемости и поверхностного натяжения суспензии микроводорослей для анализа гидратного окружения клеточных структур в аспекте солнечной активности. При концентрации микроводорослей выше  $10^{12}$  кл/л, характерной для периода активного «цветения» водоёмов, показан эффект превышения  $\epsilon'$  суспензии микроводорослей над  $\epsilon'$  дистиллированной воды. Представленные экспериментальные данные диэлектрической проницаемости и поверхностного натяжения обосновывают связь жизнедеятельности микроводорослей с характеристиками солнечной и геомагнитной активности.

**Ключевые слова:** микроводоросли, солнечная активность, гидратация, диэлектрическая проницаемость, поверхностное натяжение, миллиметровый диапазон радиоволн.

### **ВВЕДЕНИЕ**

В процессе своей жизнедеятельности микроводоросли выработали определенные механизмы адаптации, в основе которых, помимо изменения метаболической активности и биохимических реакций поддержания клеточного гомеостаза, лежат изменения физических параметров поверхностного натяжения, а также диэлектрические свойства внутриклеточных и мембранных составляющих [1]. Первоначально Солнце определяет приспособленность микроводорослей к существованию практически в любых условиях: при температуре  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  в Антарктиде и  $+85\text{--}90\text{ }^{\circ}\text{C}$  в горячих источниках. В условиях вечной мерзлоты Арктики «во время полярного дня ... непрерывное освещение и изобилие питательных солей создают в верхних слоях моря исключительно благоприятные условия для существования растительной жизни. Начинается бурное развитие микроскопических, преимущественно, одноклеточных водорослей» [Ушаков 1990, 574]. Как показывают результаты последних исследований северных льдов [2], в связи с изменением солнечной и геомагнитной активности произошло существенное изменение характеристик ледового покрова. С появлением талых озер, занимающих 25–50 % ледового покрытия, наблюдается активное развитие фитопланктона в приповерхностных водах на глубине около 1 м; причем эта биомасса превышает биомассу верхних слоев почти в 10 раз.

Для фундаментальных исследований биологических и физико-химических особенностей жизнедеятельности микроводорослей всё большее применение находят неинвазивные методы регистрации электромагнитного сигнала от

микроводорослей, основанные на откликах биосистем на клеточном и субклеточном уровнях вплоть до специфических мембранных структур и отдельных биохимических реакций. Перспектива исследования поведения микроводорослей в переменном электромагнитном поле очевидна ввиду быстроты получения данных в широком диапазоне частот ( $f = 0,1 \text{ Гц} \div 50 \text{ ГГц}$ ), скорости обработки полученного экспериментального материала, а также нахождения тех чувствительных функциональных параметров микроводорослей, которые связаны с их жизнеспособностью.

Так, диэлектрические спектры зигоспор микроводорослей талых вод, полученные методом электроротации в диапазоне частот нескольких герц – нескольких сотен мегагерц, характеризуют процессы холодной акклиматизации с изменением структуры клеточной стенки и мембраны *Chloromonas nivalis* и *Chlamydomonas nivalis* [3]. Диэлектрическая спектроскопия на частотах  $\beta$ -дисперсии позволяет контролировать концентрацию биомассы микроводорослей в биореакторах для интенсификации процессов ферментации промышленного сырья [4]. Методом КВЧ-диэлектрметрии на частотах дисперсии диэлектрической проницаемости свободной воды получена достаточно высокая корреляция между гидратацией микроводорослей и числом солнечных пятен «sunspot number» в аспекте моделирования солнечной активности с помощью терагерцового лазера, энергия излучения которого соизмерима с энергией водородной связи биомолекулы [1]. Показатели водного режима клеток, анализируемые в высокочастотном электромагнитном поле ( $f = 37,7 \text{ ГГц}$ ), являются перспективными в исследовании фотосинтетической активности микроводорослей. При этом регистрация состояния ассоциатов молекул связанной воды, формирующихся на основе гидратных центров NH, CO и полярных групп аминокислот, дает информацию об конформационных превращениях макромолекул клеточных структур, возникающих под действием различных физико-химических факторов, включая антропогенные поллютанты [5].

Целью настоящей работы является представление диэлектрической проницаемости и поверхностного натяжения как информативных характеристик в исследовании жизнедеятельности микроводорослей в аспекте солнечной и геомагнитной активности.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования – фитопланктон открытых водоёмов Харьковской области, образцы которого были взяты в летнее время в период активного «цветения» водоёмов. Микроводоросли из *Chlorophyta* – представители родов *Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Scenedesmus*, а также из *Cyanophyta* – представители рода *Myrocystis*, имеющие количественное преимущество в изучаемых образцах, были инкубированы в фотобиореакторе при температуре  $t = 27 \text{ }^\circ\text{C}$  и освещении  $6,6 - 7,4 \text{ Вт/м}^2$  для дальнейшего микроскопирования под световым микроскопом  $\times 600$ .

Диэлектрическую проницаемость ( $\epsilon'$ ) суспензии микроводорослей оценивали по электромагнитному отклику биологической системы ( $U$ , дБ) при экспозиции клеток в измерительной ячейке 8-мм волноводного тракта на частоте  $f = 37,7 \text{ ГГц}$ , входящей в область дисперсии диэлектрической проницаемости свободной воды ( $f$

= 10 ГГц ÷ 50 ГГц). Объем суспензии микроводорослей в измерительной кювете не превышал  $V = 12$  мкл. Точность относительных измерений по  $\epsilon'$  составила  $\Delta = \pm 1$  %; точность измерений по абсолютным значениям  $\epsilon'$  составила  $\pm 3,5$  %.

Измерение коэффициента поверхностного натяжения суспензии микроводорослей ( $\sigma$ ), пропорционального медианной частоте ( $F_{med.}$ ), проводилось с помощью кюветы, размещенной на пьезо-платформе и помещенной в раскрыт 8-мм волновода при скрининге («sweep»-режим) звуковых частот ( $f = 20 \div 60$  Гц), входящих в область собственных колебаний системы пьезо-платформа-измерительная кювета. Температурная коррекция приводилась к  $t = 25$  °С. Калибровка и рабочие номограммы осуществлялись по водно-спиртовым, водно-кислотным и солевым растворам.

Частотный анализ проводился с помощью специально разработанного программного обеспечения с помощью быстрого Фурье-преобразования (БФП), при этом объем измерительной сессии (комплексного ММВ и звукового файла) не превышал 0,5 Гб; длительность не более 120 сек. Точность измерений, с учетом погрешности дозатора, не более  $\pm 0,05$  Гц.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что характер взаимодействия электромагнитной волны с биологическим объектом определяется как параметрами излучения (частотой, скоростью распространения, когерентностью колебания, поляризацией волны), так и физическими свойствами (диэлектрическая проницаемость, поверхностное натяжение и др.) биологического объекта как среды, в которой распространяется электромагнитная волна. Электрические свойства клеток в диапазоне радиочастот достоверно характеризуют их биологическую полноценность и находятся в непосредственной связи с целостностью физико-химической структуры клеточной оболочки, ответственной за её поляризационные свойства [6].

В ходе эксперимента регистрировался электромагнитный отклик суспензии микроводорослей в дневное и вечернее время, в дни с различной солнечной и геомагнитной активностью, характеризующиеся определенным числом солнечных пятен «sunspot number» и параметром К-index, соответственно. На рисунках 1 и 2 представлен частотный анализ электромагнитного отклика (измерительная сессия 12.08.2014 г. и 13.08.2014 г.) для определения медианных частот и поверхностного натяжения в области акустического резонанса 1-го мода колебаний при «sweep»-режиме акустических частот для дистиллированной воды и суспензии микроводорослей. Совпадение спектральных данных по дистиллированной воде 12.08.2014 г. и 13.08.2014 г. обусловлено температурой в лаборатории в дневные и вечерние часы, которая отличалась не более чем на 0,3 °С (эти дни августа совпали с температурным максимумом 2014 г. по Харьковской области).

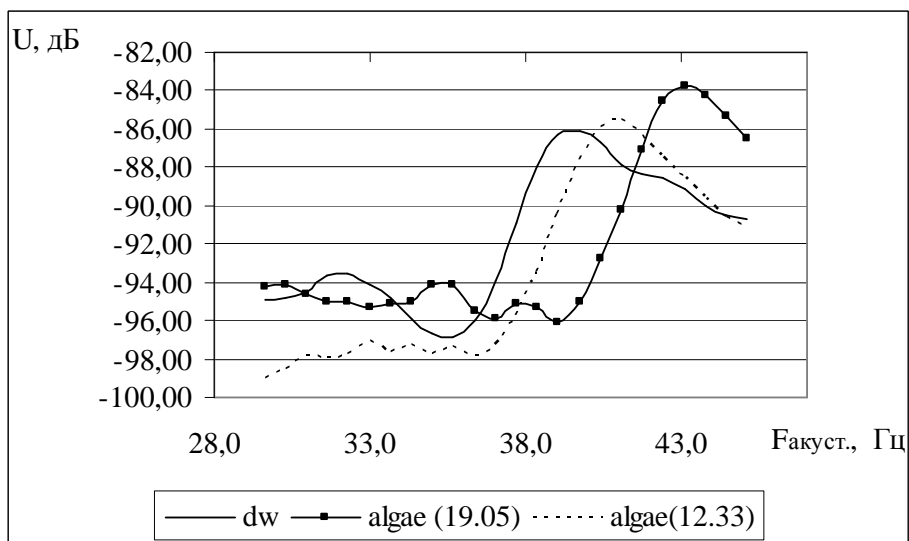


Рис. 1. Электромагнитный отклик ( $U$ , дБ) суспензии микроводорослей в области акустического резонанса 1-го мода колебаний при «sweep»-режиме ( $f = 28 \div 50$  Гц) по отношению к дистиллированной воде ( $t = 12.33$  – Солнце в зените;  $t = 19.05$  – закат Солнца). Измерения 12.08.2014 г.

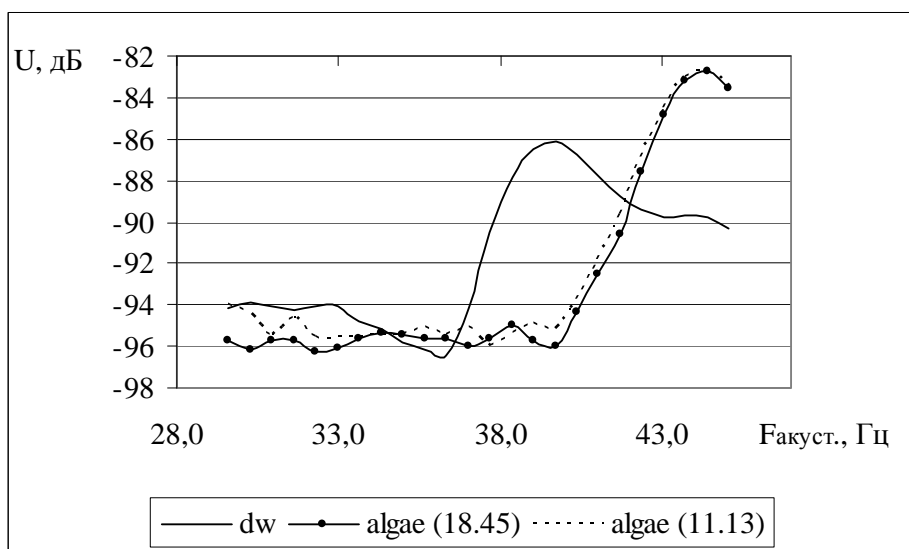


Рис. 2. Электромагнитный отклик ( $U$ , дБ) суспензии микроводорослей в области акустического резонанса 1-го мода колебаний при «sweep»-режиме ( $f = 28 \div 50$  Гц) по отношению к дистиллированной воде ( $t = 11.13$  – Солнце в зените;  $t = 18.45$  – закат Солнца). Измерения 13.08.2014 г.

Из представленных на рисунках 1 и 2 экспериментальных данных электромагнитного отклика суспензии микроводорослей следует превышение параметра  $\varepsilon'$  относительно  $\varepsilon'$  воды на  $1,7 \cdot 10^{-12}$  ф/м, что составило разницу в 0,2 единицы  $\varepsilon'$  в системе СГС (после соответствующего пересчета медианных частот и уровня электромагнитного сигнала в реальную часть диэлектрической проницаемости); при этом разница в коэффициенте поверхностного натяжения составила  $\sigma = 2,3$  дин/см. Известно, что жизнедеятельность микроводорослей имеет тесную связь с бактериальным окружением, которое изменяет свою активность в зависимости от действия факторов биотической и абиотической природы. «Цветение» воды приходится на период температурных максимумов окружающей среды и высокого уровня надводной освещенности; при этом бактериальное окружение характеризуется интенсивным делением клеток, интенсификацией процессов дыхания и продуцирования органических веществ [7]. Окружающая микроводоросли биомасса бактерий в этот период максимальна по величине и видовому разнообразию и подобна «бахроме» со строго упорядоченной структурой, в которой молекулы воды выстраиваются определенным образом с индикатрисой рассеяния электромагнитного сигнала, обеспечивающей диэлектрическую проницаемость биологической системы (микроводоросли-бактериальное окружение)  $\varepsilon' > 23$  при концентрации микроводорослей более  $10^{12}$  кл/л.

Обобщенные данные измерений диэлектрической проницаемости и поверхностного натяжения суспензии микроводорослей с учетом характеристик солнечной активности приведены в таблице 1. Следует отметить, что измерения по абсолютному значению действительной части диэлектрической проницаемости не были строго синхронизованы с измерительными сессиями по определению медианных частот и, соответственно, поверхностного натяжения. Разброс по времени составлял около 3-х часов.

Таблица 1

**Изменение диэлектрической проницаемости и поверхностного натяжения суспензии микроводорослей в аспекте солнечной активности**

Дата	Время	$\Delta\varepsilon' \cdot 10^{-12}$ ф/м	$\Delta F_{\text{med.}}$ , Гц	$\Delta\sigma$ , дин/см	sunspot number
12.08.2014	12.30	$0,5 \pm 0,7$	$0,9 \pm 0,1$	$0,65 \pm 0,2$	82
	19.00	$1,7 \pm 0,7$	$3,3 \pm 0,1$	$1,63 \pm 0,2$	82
13.08.2014	11.30	$1,9 \pm 0,7$	$3,9 \pm 0,1$	$1,92 \pm 0,2$	80
	19.00	$2,5 \pm 0,7$	$4,6 \pm 0,1$	$2,23 \pm 0,2$	80

$$\Delta\varepsilon' = \varepsilon'_{\text{alg.}} - \varepsilon'_{\text{dw.}}, \text{ где}$$

$\varepsilon'_{\text{alg.}}$  и  $\varepsilon'_{\text{dw.}}$  – диэлектрическая проницаемость микроводорослей и дистиллированной воды, соответственно;

$$\Delta F_{\text{med.}} = F_{\text{med.alg.}} - F_{\text{med.dw.}}, \text{ где}$$

$F_{\text{med.alg.}}$  и  $F_{\text{med.dw.}}$  – медианная частота электромагнитного отклика микроводорослей и дистиллированной воды, соответственно;



$$\Delta\sigma = \sigma_{\text{Fmed.alg.}} - \sigma_{\text{Fmed.dw.}}, \text{ где}$$

$\sigma_{\text{Fmed.alg.}}$  и  $\sigma_{\text{Fmed.dw.}}$  – поверхностное натяжение микроводорослей и дистиллированной воды, соответственно.

K-index – основной параметр геомагнитной активности, описывающий вариации магнитного поля Земли, при этом геомагнитная активность, тесно связанная с солнечной активностью, является важным элементом космической погоды, влияющей на многие процессы жизнедеятельности биологических систем различных уровней организации [8]. Концентрация фотосинтетического пигмента хлорофилла *a* в клетках микроводорослей может достигать в период активного «цветения» максимального уровня (до 2,5 мг/л); при этом отмечается корреляция количества микроводорослевых клеток и концентрации хлорофилла *a* с параметрами гидратации [5], солнечной и геомагнитной активностью [9–11]. На рисунке 3 показан суточный ход геомагнитной активности 12.08.2014 г. и 13.08.2014 г.

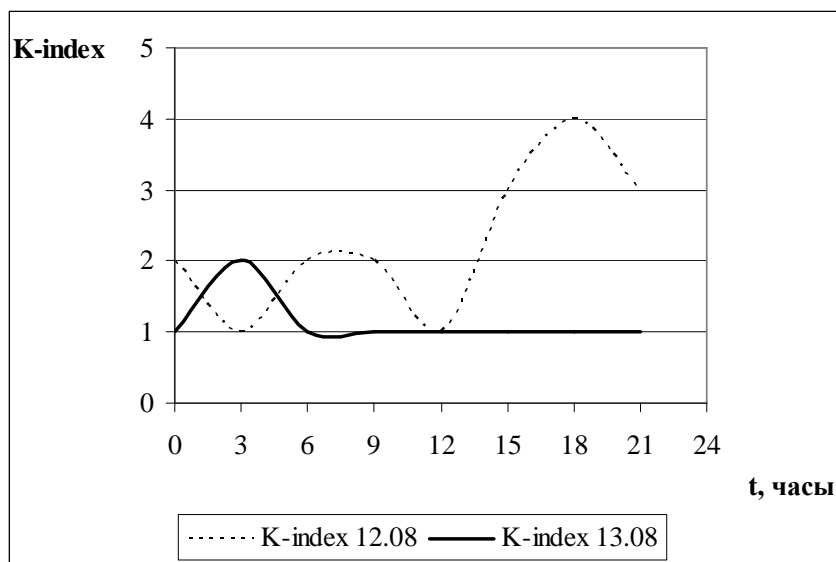


Рис. 3. Суточный ход уровня геомагнитной активности. K-index – 4 (12.08.2014 г.) и K-index – 1 (13.08.2014 г.).

Анализируя полученные результаты электромагнитного отклика микроводорослей в аспекте солнечной активности («sunspot number») и геомагнитной активности (K-index), следует отметить достаточно выраженную взаимосвязь поверхностного натяжения ( $\sigma$ ) с K-index. Так, 12.08.2014 г. почти весь день регистрировался переменный характер K-index по сравнению с уровнем K-index 13.08.2014 г., когда с пяти часов утра и до конца дня уровень его не менялся и

составлял 1,0 [<http://www.spaceweather.com>], [<http://www.geospace.com.ua>]. В ходе эксперимента 12.08.2014 г. в 11.33 на уровне электромагнитного отклика суспензии микроводорослей  $U = -90$  дБ была зарегистрирована  $F_{\text{мед.}} = 38,7$  Гц, а 13.08.2014 г. в 11.33 на том же уровне электромагнитного отклика  $F_{\text{мед.}}$  составила 42,1 Гц.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Показан эффект превышения значений параметров диэлектрической проницаемости и поверхностного натяжения микроводорослей в период активного «цветения» водоёмов (при определенной концентрации клеток) над таковыми параметрами воды, что связано с определенной взаимосвязью микроводорослей с бактериальным окружением их клеток.
2. Показана связь параметров диэлектрической проницаемости и поверхностного натяжения с процессами жизнедеятельности микроводорослей в аспекте солнечной и геомагнитной активности (sunspot number, K-index).

### Список литературы

1. Колесников В.Г. Связь солнечной активности с электромагнитным откликом микроводорослей открытых водоёмов Харьковской области / В.Г. Колесников, Н.В. Древаль, Ю.Е. Каменев, В.Г. Корж // Физика живого.– 2009.– Т. 17, № 1.– С. 98-104.
2. Arrigo K.R. Massive Phytoplankton Blooms Under Arctic Sea Ice / K.R. Arrigo, D.K. Perovich, R.S. Pickart [ et al.] // Science.– 2012.– V. 336.– P. 1408.
3. Muller T. Dielectric single cell spectra in snow algae / T. Muller, Th. Schnelle, G. Fuhr // Polar. Biol.– 1998.– Vol. 20.– P. 303–310.
4. Alborno M.A. G. Strategies to overcome interferences during biomass monitoring with dielectric spectroscopy: submitted for the degree of Doctor of Philosophy / Manuel Alberto Garcia Alborno.– Heriot-Wall University, School of Engineering and Physical Sciences.– 2013.– 199 p.
5. Паршикова Т.В. Экспересс-контроль роста и физиологического состояния микроводорослей / Т.В. Паршикова, Л.А. Сиренко, Т.Ю. Щеголева, В.Г. Колесников // Альгология.– 2001.– Т.11, № 3.– С. 403–413.
6. Седунов Б.И. Диэлектрическая проницаемость биологических веществ / Б.И. Седунов, Д.А. Франк-Каменецкий // Успехи физических наук.– 1963.– Т.79.– Вып. 4.– С. 617-639.
7. Trabelsi A. Effect of bacterial community dynamics on DOC seasonal changes in the north-western Mediterranean Sea / A. Trabelsi, F. Rassoulzadegan // J. Plankton research.– 2011.– Vol. 33, № 8.– P. 1249–1262.
8. Rangarajan G.K. Time variations of geomagnetic activity indices  $K_p$  and  $A_p$ : an update / G.K. Rangarajan, T. Iyemori // Ann. Geophysicae.– 1997.– Vol.15.– P. 1271-1290.
9. Wu H. Effects of solar UV radiation on morphology and photosynthesis of filamentous cyanobacterium *Arthrospira platensis* / H. Wu, K. Gao, V. Villafañe, T. Watanabe, E. Helbling // Applied and Environmental Microbiology.– 2005.– Vol. 71.– P. 5004–5013.
10. Donkor V. Effects of ultraviolet irradiation on photosynthetic pigments in some filamentous cyanobacteria / V. Donkor, D. Hader // Aquatic Microbial Ecology.– 1996.– Vol. 11.– P. 143–149.
11. Hu W. Weather Variability, Sunspots, and the Blooms of Cyanobacteria / W. Hu, D. Connell, K. Mengersen, Sh. Tong // EcoHealth.– 2009.– Vol. 6.– P. 71–78.

PERMITTIVITY AND SURFACE TENSION FOR THE ESTIMATION OF  
MICROALGAE'S VITAL FUNCTION*Khmel N.V.**Usikov Institute of radiophysics and electronics of National Academy of sciences of Ukraine,  
Kharkov, Ukraine  
E.mail: dreval@ire.kharkov.ua*

The investigation of permittivity and surface tension of microalgae's suspension for the analysis of cells structures hydration in aspect of solar activity was carried out. The effect of the excess  $\epsilon'$  microalgae's suspension over  $\epsilon'$  distilled water at concentration of microalgae above  $10^{12}$  cells/l, which is typical for the period of active «bloomings» of reservoirs was shown. The presented experimental data of permittivity and surface tension prove of communication of microalgae's vital function with characteristics of solar and geomagnetic activity.

Microalgae cells in the process of vital function the definite mechanisms of adaptation have developed. In the basis of these mechanisms there are changes of metabolic activity, biochemical reactions of cells homeostasis maintenance, and also changes of physical parameters as surface tension and permittivity of intracellular and membrane components.

For fundamental investigations of biological and physical and chemical features of microalgae's vital function the non-invasive methods of electromagnetic signal registration more and more have applied. In basis of methods is the high-sensitivity responses of biosystems at cellular and subcellular levels up to specific membrane structures and individual biochemical reactions. The perspective of investigation of microalgae's behaviour in a variable electromagnetic field is obvious in view of speed of data acquisition in a wide range of frequencies ( $f = 0,1 \text{ Hz} \div 50 \text{ GHz}$ ), speeds of processing of the received experimental material, and also a finding of those sensitive functional parameters of microalgae which are connected with their vital function.

The phytoplankton of open reservoirs of the Kharkov region from *Chlorophyta* – *Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Scenedesmus* and *Cyanophyta* – *Mycrocystis* in active «bloomings» reservoirs was used as objects for investigation of electromagnetic response of microalgae's cells. Permittivity ( $\epsilon'$ ) and surface tension ( $\sigma$ ) of microalgae's suspension in aspect of solar and geomagnetic activity were measured. From experimental data of the electromagnetic response of microalgae's suspension excess of parameter  $\epsilon'$  over  $\epsilon'$  water on  $1,7 \cdot 10^{-12} \text{ F/m}$ ; thus the difference in parameter surface tension was  $\sigma = 2,3 \text{ dynes/cm}$ .

It is known the definite connection between microalgae cells and their bacterial environment which changes their activity depending on action of biotic and abiotic factors. The biomass of bacteria surrounding microalgae in period of «bloomings» reservoirs is presented as much as possible by quantity ( $\sim 10^8$  cells/l) and a variety, and is similar to «fringe» with strictly ordered structure, in which water molecules are built definitely with indicatrix providing biological system the permittivity  $\epsilon' > 23$  at microalgae concentration more than  $10^{12}$  cells/l.

Analysis of the received results has been shown the significant connection of

microalgae's electromagnetic response with surface tension in aspect of solar activity («sunspot number») and geomagnetic activity (K-index).

**Keywords:** microalgae, solar activity, hydration, permittivity, surface tension, millimetric range of radio-waves.

#### References

1. Kolesnikov V.G., Dreval N.V., Kamenev Yu.E., Korzh V.G. The connection of solar activity with microalgae's electromagnetic response of open reservoirs of Kharkov region, *Physics of alive*, **17**, No 1, 98 (2009).
2. Arrigo K. R., Perovich D. K., Pickart R. S. [et al.]. Massive Phytoplankton Blooms Under Arctic Sea Ice, *Science*, **336**, 1408 (2012).
3. Muller T., Schnelle Th., Fuhr G. Dielectric single cell spectra in snow algae, *Polar. Biol.*, **20**, 303 (1998).
4. Albornoz M. A. G. *Strategies to overcome interferences during biomass monitoring with dielectric spectroscopy*, 199 p. (Heriot-Wall University, School of Engineering and Physical Sciences, 2013).
5. Parshikova T.V., Sirenko L.A., Shchegoleva T.Yu., Kolesnikov V.G. Express-control of growing and physiological state of microalgae, *Algology*, **11**, No 3, 403 (2001).
6. Sedunov B.I., Frank-Kamenetski D.A. Permittivity of biological substances, *Successes of physical sciences*, **79**, 4, 617 (1963).
7. Trabelsi A., Rassoulzadegan F. Effect of bacterial community dynamics on DOC seasonal changes in the north-western Mediterranean Sea, *J. Plankton research*, **33**, No 8, 1249 (2011).
8. Rangarajan G. K., Iyemori T. Time variations of geomagnetic activity indices Kp and Ap: an update, *Ann. Geophysicae*, **15**, 1271 (1997).
9. Wu H., Gao K., Villafan˜e V, Watanabe T., Helbling E. Effects of solar UV radiation on morphology and photosynthesis of filamentous cyanobacterium *Arthrospira platensis*, *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 5004 (2005).
10. Donkor V., Hader D. Effects of ultraviolet irradiation on photosynthetic pigments in some filamentous cyanobacteria, *Aquatic Microbial Ecology*, **11**, 143 (1996).
11. Hu W., Connell D., Mengersen K., Tong Sh. Weather Variability, Sunspots, and the Blooms of Cyanobacteria, *EcoHealth*, **6**, 71 (2009).

Поступила в редакцию 07.11.2014 г.

**УДК 612:159.91:615.3**

**ВЛИЯНИЕ СВЕРХМАЛЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ БЕНЗИМИДАЗОЛА  
НА ПОВЕДЕНИЕ КРЫС В ТЕСТЕ ПОРСОЛТА В НОРМЕ И НА ФОНЕ  
АКТИВАЦИИ ДОФАМИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ЮМЕКСОМ**

*Черетаев И.В., Коренюк И.И., Гамма Т.В., Хусаинов Д.Р.*

*Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Россия  
E-mail: 5612178@ukr.net*

В статье представлены результаты изучения влияния сверхмалых концентраций бензимидазола на поведенческие реакции крыс в тесте Порсолта в норме и на фоне активации дофаминергической системы. Показано, что при функционировании дофаминергической системы в норме бензимидазол в сверхмалых концентрациях ( $10^{-14}$ ,  $10^{-13}$  и  $10^{-12}$  М) проявляет продепрессантные свойства. Активация дофаминергической системы юмексом (3 мг/кг) нивелирует продепрессантные эффекты бензимидазола в концентрациях  $10^{-14}$  и  $10^{-12}$  М, изменяя их на антидепрессантные, или ослабляя - в концентрации  $10^{-13}$  М. Эти результаты подтвердили предположения о том, что данная медиаторная система вовлечена в механизм реализации психоактивных свойств бензимидазола.

**Ключевые слова:** бензимидазол, сверхмалые концентрации, дофаминергическая система, юмекс.

**ВВЕДЕНИЕ**

В связи с широкой распространённостью у людей современного общества тревожно-депрессивных расстройств [1], особое внимание исследователей привлекает поиск среди известных и новосинтезированных соединений новых эффективных антидепрессантных средств, выяснение механизма их физиологического действия [2-4]. Поскольку функциональная активность дофаминергической медиаторной системы мозга животных и человека является одним из ведущих факторов, который определяет возникновение и проявление поведенческих состояний страха, тревожности и депрессии [2, 4, 5], механизм эффективности многих антидепрессантных средств зависит именно от функциональной активности этой системы [4-6].

Следует отметить, что согласно данным недавних исследований [6, 7] разнообразными психоактивными свойствами в обычных и даже сверхмалых концентрациях может обладать бензимидазол. Изучению физиологических эффектов сверхмалых (ниже  $10^{-11}$  М) концентраций различных химических веществ сейчас уделяется всё большее внимание в биомедицине и физиологии, ввиду их большей безопасности по сравнению с концентрациями, используемыми в терапевтической практике [8, 9].

В связи со сказанным выше, можно предположить, что дофаминергическая медиаторная система участвует в механизме реализации психоактивных свойств бензимидазола в сверхмалых концентрациях, а изменение функциональной

активности этой системы приводит к существенным изменениям эффектов данного вещества. Однако эта гипотеза требует экспериментального подтверждения.

Целью данного исследования – выяснить влияние бензимидазола в сверхмалых концентрациях на поведенческие реакции крыс в тесте Порсолта в норме и на фоне активации дофаминергической медиаторной системы юмексом.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования выполнены на 80 белых беспородных крысах-самцах массой 250-280 г (8 групп по 10 особей в каждой). Четырём экспериментальным группам животных для увеличения функциональной активности дофаминергической медиаторной системы в течение 14 дней внутрибрюшинно вводили по 0,2 мл препарата юмекс в дозе 3 мг/кг («Chinoïn», Венгрия). Действующий компонент юмекса селегилин специфически ингибирует моноаминоксидазу Б, разрушающую дофамин [3, 4, 10, 11], т. е. пролонгирует его эффект. Одна из четырёх указанных групп в дальнейшем не подвергалась инъекциям каких-либо веществ. Трём группам крыс после 14-дневного курса инъекций юмекса и трём оставшимся группам без них (функционирование дофаминергической медиаторной системы в норме) вводили внутрибрюшинно 0,2 мл бензимидазола (синтезирован в Таврическом национальном университете им. В.И. Вернадского, химическая чистота 98 %) в одной из следующих концентраций –  $10^{-14}$ ,  $10^{-13}$  и  $10^{-12}$  М. Контрольной группе крыс внутрибрюшинно вводили 0,2 мл физиологического раствора. Инъекции физиологического раствора, как и разведённого им по методу Ганемана [9] до необходимых концентраций бензимидазола, осуществляли за 30 мин. до начала эксперимента.

Поведенческие реакции животных на фоне воздействия тестируемых веществ исследовали в моделирующем депрессию в условиях сильного поведенческого стресса тесте вынужденного плавания Порсолта [12]. Кроме основных показателей теста рассчитывали индекс депрессивности (отношение суммарного времени пассивного плавания животных к суммарному времени активного плавания) [5]. Статистическое сравнение результатов осуществляли с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни [13]. Данные представлены в виде среднего и ошибки среднего.

При выполнении экспериментов соблюдали этические нормы и принципы Хельсинкской Декларации 1975 г., пересмотренной и дополненной в 2000 г. Исследования одобрены Комитетом по биоэтике Таврического национального университета имени В. И. Вернадского.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В условиях нормального функционирования дофаминергической медиаторной системы выяснено, что бензимидазол в концентрации  $10^{-14}$  М не вызывал достоверных изменений показателей теста относительно контроля (Рис. 1, А), а в концентрациях  $10^{-13}$  и  $10^{-12}$  М достоверно уменьшал ( $p \leq 0,01$ ) время активного плавания крыс и увеличивал ( $p \leq 0,01$ ) время пассивного плавания (рис., Б и В). В концентрации  $10^{-13}$  М бензимидазол кроме того снижал ( $p \leq 0,05$ ) латентный период

первого зависания животных в воде. Все указанные изменения [12] свидетельствуют о проявлении продепрессантных свойств бензимидазола в концентрациях  $10^{-13}$  и  $10^{-12}$  М.

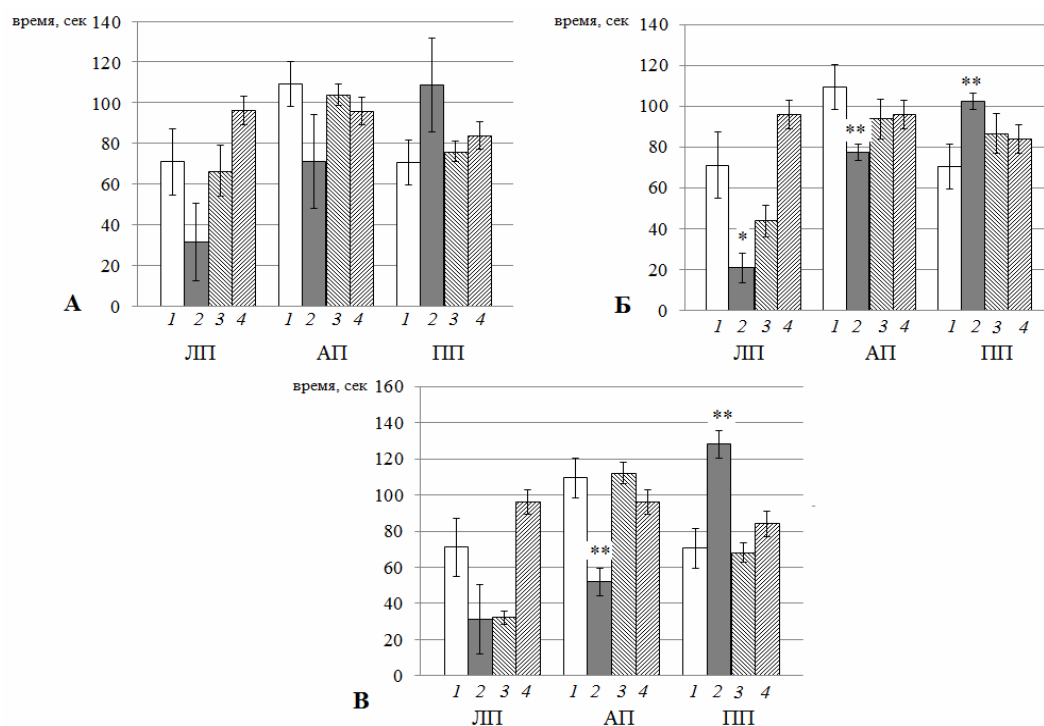


Рис. Влияние сверхмалых концентраций бензимидазола на поведенческие реакции крыс в тесте Порсолта в норме и на фоне активации дофаминергической медиаторной системы юексом

Примечание: концентрация бензимидазола на рис. А –  $10^{-14}$ , Б –  $10^{-13}$ , В –  $10^{-12}$  М. ЛП – латентный период первого зависания, АП и ПП – время активного и пассивного плавания соответственно. Цифрами отмечены: 1 – контроль, 2 – эффекты бензимидазола при функционировании дофаминергической медиаторной системы в норме, 3 – эффекты бензимидазола при активации дофаминергической медиаторной системы юексом, 4 – эффекты самого юекса; \* –  $p \leq 0,05$ , \*\* –  $p \leq 0,01$  – достоверные изменения показателей относительно контроля.

В условиях активации дофаминергической медиаторной системы юексом бензимидазол по сравнению с контролем в изученных концентрациях ( $10^{-14}$ ,  $10^{-13}$  и  $10^{-12}$  М) не вызывал существенных изменений показателей теста Порсолта (Рис. 1, А-В). Анализ времени активного и пассивного плавания животных показал, что на фоне активации дофаминергической медиаторной системы юексом продепрессантные эффекты бензимидазола в концентрациях  $10^{-13}$  и  $10^{-12}$  М не проявлялись. Из этого следует, что в этих сверхмалых концентрациях

продепрессантные эффекты бензимидазола связаны с функционированием дофаминергической медиаторной системы и устраняются при её активации.

Сам юмекс по сравнению с контролем (Рис. 1) также не вызывал достоверных изменений основных показателей теста (латентный период первого зависания животных в воде, время активного и пассивного плавания).

Для того чтобы более детально проследить изменения уровня депрессии у крыс разных групп под влиянием сверхмалых концентраций бензимидазола в норме и на фоне повышения функциональной активности дофаминергической медиаторной системы юмексом рассчитывали индекс депрессивности (табл. 1). Оказалось, что при функционировании дофаминергической медиаторной системы в норме продепрессантные свойства бензимидазола проявлялись во всех изученных концентрациях, возрастая с их увеличением и достигая максимальной выраженности в концентрации  $10^{-12}$  М (табл. 1). Согласно [5], увеличение индекса депрессивности выше 1, который удалялся от неё в сторону увеличения по мере возрастания применяемой концентрации бензимидазола, свидетельствует о его продепрессантных эффектах. Эффект юмекса при этом достоверно не отличался от контроля.

**Таблица 1**  
**Индекс депрессивности крыс ( $M \pm m$ ) в тесте Порсолта под влиянием сверхмалых концентраций бензимидазола в норме и в условиях активации дофаминергической системы юмексом (3 мг/кг)**

Вещество, доза или концентрация	Индекс депрессивности, усл. ед.
Физиологический раствор (контроль)	$0,72 \pm 0,12$
Бензимидазол $10^{-14}$ М	$1,81 \pm 0,24$ **
Бензимидазол $10^{-13}$ М	$1,38 \pm 0,14$ **
Бензимидазол $10^{-12}$ М	$4,66 \pm 1,79$ **
Юмекс 3 мг/кг + бензимидазол $10^{-14}$ М	$0,75 \pm 0,05$
Юмекс 3 мг/кг + бензимидазол $10^{-13}$ М	$1,00 \pm 0,12$ **
Юмекс 3 мг/кг + бензимидазол $10^{-12}$ М	$0,61 \pm 0,06$ **
Юмекс 3 мг/кг	$0,92 \pm 0,10$

Примечание: \* –  $p \leq 0,05$ , \*\* –  $p \leq 0,01$  – достоверные изменения показателей относительно контроля.

Анализ индекса депрессивности также показал, что на фоне активации ДМС продепрессантные свойства бензимидазола в концентрациях  $10^{-14}$  и  $10^{-12}$  М изменялись на антидепрессантные, а в концентрации  $10^{-13}$  М продепрессантный эффект бензимидазола нивелировался.

Таким образом, дофаминергическая медиаторная система играет важную роль в механизме продепрессантного действия бензимидазола в условиях сильного поведенческого стресса. Возможно, что в условиях целенаправленного угнетения функциональной активности дофаминергической медиаторной системы, наоборот, будет происходить усиление продепрессантных свойств бензимидазола в указанных



концентрациях. Это предположение требует подтверждения в дальнейших исследованиях.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Доказано, что дофаминергическая медиаторная система вовлечена в механизм реализации психоактивных свойств бензимидазола в сверхмалых концентрациях ( $10^{-14}$ ,  $10^{-13}$  и  $10^{-12}$  М).

1. В тесте Порсолта обнаружено, что в норме бензимидазол в сверхмалых концентрациях  $10^{-14}$ ,  $10^{-13}$  и  $10^{-12}$  М проявляет продепрессантные свойства.
2. На фоне активации дофаминергической системы юмексом (3 мг/кг) продепрессантный эффект бензимидазола в концентрациях  $10^{-14}$  и  $10^{-12}$  М изменяется на антидепрессантный, а в концентрации  $10^{-13}$  М – ослабляется.

### Список литературы

1. Богута Р. Эпидемиология психических расстройств: опыт проведения первого национального исследования психического здоровья / Р. Богута, А. Бухановский, Ю. Закаль // Вестник Ассоциации психиатров Украины. – 2011. – № 2. – С. 13–17.
2. Гайдук А.В. Фармакология антидепрессантов // А.В. Гайдук, Н.А. Бизунок // Лечебное дело. – 2012. – № 1. – С. 69–78.
3. Мосолов С.Н. Клиническое применение современных антидепрессантов / С.Н. Мосолов. – СПб.: Мед. информ. агенство, 1995. – 565 с.
4. Сапегин И.Д. Базисная фармакология / И.Д. Сапегин. – Симферополь : КГМУ, 2012. – 122 с.
5. Калуев А.В. Нейротропные эффекты бензилпенициллина в экспериментальных моделях стресса у крыс/ А.В. Калуев. – К.: ЦФБП, 2002. – 150 с.
6. Гамма Т.В. Влияние бемитила и бензимидазола на поведение крыс в тесте «открытое поле» / Т.В.Гамма, И.И. Коренюк // Нейрофизиология / Neurophysiology. – 2006. – № 1. – С. 71–76.
7. Гамма Т.В. Поведенческие реакции крыс при действии некоторых производных бензимидазола в сверхнизких концентрациях. Учёные записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». // Т.В. Гамма. – 2013. – № 1. – С. 30–36.
8. Бурлакова Е.Б. Действие сверхмалых доз биологически активных веществ и низкоинтенсивных физических факторов / Е. Б. Бурлакова, А. А. Конрадова, Е. Л. Мальцева // Химическая физика. – 2003. – № 2. – С. 21–40.
9. Славецкая М. Сверхмалые дозы биологически активных веществ как основа лекарственных препаратов для ветеринарии / М. Славецкая, Н. Капай – М.: Аквариум-Принт, 2012. – 168 с.
10. Коваленко В. Н. Компендиум – 2005 – лекарственные препараты / В.Н. Коваленко, А.П. Викторов – К.: Морион, 2005. – 1920 с.
11. Нодель М.Р. Болезнь Паркинсона: жизнь продолжается. – М.: ММА им. И. М. Сеченова, 2010. – 36 с.
12. Porsolt R. D. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments / R.D. Porsolt, M. Le Pinchon, M. Jalfre // Nature. – 1977. – № 5604. – P. 730–732.
13. Лакин Г. Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. – М. : Высшая школа, 1990. – 352 с.

**INFLUENCE ULTRA-LOW CONCENTRATIONS OF BENZIMIDAZOLE ON  
RAT BEHAVIOR IN THE PORSOLT TEST ON THE BACKGROUND  
ACTIVATION DOPAMINERGIC SYSTEM BY UMEX**

*Cheretaev I.V., Koreniuk I.I., Gamma T.V., Khusainov D.R.*

*Tavrida National V.I. Vernadsky University, Simferopol, Republic of Crimea, Russia  
E-mail: 5612178@ukr.net*

Due to the prevalence of people of modern society anxiety-depressive disorders, attention of researchers attracts search among known and newly synthesized new compounds effective antidepressant funds, elucidation of the mechanism of their physiological actions. Since the functional activity of the dopaminergic neurotransmitter system in the brain of animals and humans is one of the leading factors that determines the emergence and manifestation of behavioral state of fear, anxiety and depression, the mechanism of the antidepressant efficacy of many of the funds depends on the functional activity of this system.

Studies performed on 80 outbred rats-males weighing 250-280 g (8 groups of 10 animals each). Four experimental groups of animals to increase the functional activity of the dopaminergic neurotransmitter system within 14 days intraperitoneally injected with 0.2 ml of the drug Umex dose of 3 mg/kg ("Chinoin", Hungary). The active component of umex selegiline specifically inhibits monoamine oxidase B, Deplete dopamine. One of the four specified groups was not subjected to the injection of any substance. Three groups of rats after 14-day course of injections umex and the three remaining groups without them were injected intraperitoneally with 0.2 ml of benzimidazole in one of the concentrations  $10^{-14}$ ,  $10^{-13}$  and  $10^{-12}$  M. The control group rats were injected intraperitoneally with 0.2 ml of saline. Injections of saline, and diluted them according to the method of Hahnemann to the required concentrations benzimidazole, was carried out for 30 minutes before the start of the experiment.

Behavioral responses of animals on the background of the effects of the test substances was investigated in modeling depression in strong behavioral stress test forced the Porsolt swim. In addition to the main indicators of the test was calculated index of depression (the ratio of total time passive swimming animals to the total time of active swimming). Statistical comparison of the results was performed using the nonparametric U-test, Mann-Whitney. Data are presented as mean and error of the mean.

During the experiments comply with ethical norms and the principles of the Helsinki Declaration of 1975, as revised and amended in 2000. Research was approved by the bioethics Committee of Taurida National V. I. Vernadsky University.

The paper presents data learning the influence ultra-low concentrations of benzimidazole on rat behavioral responses in the Porsolt test on the background activation dopaminergic system. It is shown that the operation of dopaminergic system in normal exhibits prodepressive properties of benzimidazole at ultra-low concentrations ( $10^{-14}$ ,  $10^{-13}$  and  $10^{-12}$  M). It is proved that activation of the dopaminergic system by umex (3 mg/kg) eliminates depressive effects of benzimidazole at concentrations  $10^{-14}$  and  $10^{-12}$  M, changing it to the antidepressant or relaxing – at a concentration  $10^{-14}$  M. These data confirms the assumption that this mediator system is involved in the mechanism for

implementing the psychoactive properties of benzimidazole.

**Keywords:** benzimidazole, ultra-low concentrations, dopaminergic system, umex.

#### References

1. Bogota R., Bukhanovskij A., Sakal Yu., Epidemiology of mental health disorders: experience of the first national mental health research, *Bulletin of the Association of psychiatrists of Ukraine*, **2**, 13 (2011).
2. Gaiduk A.V., Bisunok N.A., Pharmacology of antidepressants, *Medical care*, **1 (23)**, 69 (2012).
3. Mosolov S.N., Clinical application of modern antidepressants, 565 p. (Med. inform. Agency, SPb., 1995).
4. Sapegin I.D., *Basic pharmacology*, P. 1, 122 p. (KSMU Simferopol, 2012).
5. Kaluev A.V. Neurotropic effects of benzylpenicillin in experimental models of stress in rats, 150 p. (CFBP, Kiev, 2002).
6. Gamma T.V., Koreniuk I.I. Influence bemethyl and benzimidazole on the behavior of rats in the open field test, *Neurophysiology / Neurophysiology*, **38 (1)**, 71 (2006).
7. Gamma T.V. Behavioral responses of rats under the action of some derivatives of benzimidazole in very low concentrations, *Scientific notes of Taurida national V.I. Vernadsky University. "Biology, chemistry"*, **26 (1)**, 30 (2013).
8. Burlakova E.B., Konradova A.A., Maltseva E.L., Effect of ultra-low doses of biologically active substances and low-intensity physical factors, *Chemical physics*, **22 (2)**, 21 (2003).
9. Slaveckaya M., Capai N., *Ultra-low doses of biologically active substances as a basis for medicinal products for veterinary use*, 168 p. (Aquarium-Print, Moscow, 2012).
10. Kovalenko V.N., Viktorov A.P., *Compendium - 2005 – drugs*, 1920 p. (Morion, Kiev, 2005).
11. Nodel M.R., *Parkinson's Disease: life goes*, 36 p. (I. M. Sechenov MMA, Moscow, 2010).
12. Porsolt R. D., Le Pinchon M, Jalfre M., Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments, *Nature*, **5604**, 730 (1977).
13. Lakin G.F., *Biometrics*, 352 p. (High school, Moscow, 1990).

*Поступила в редакцию 09.11.2014 г.*

# ХИМИЧЕСКИЕ НАУКИ

---

Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского  
Серия «Биология, химия». Том 27 (66). 2014. № 4. С. 100-108.

УДК 577.181.5+615.076.7+615.281.9

## КИНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ С ПОЛИМИКСИНОМ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫМ МЕТОДОМ

*Кацев А.М.*

*Крымский государственный медицинский университет имени С. И. Георгиевского,  
Симферополь, Россия  
E-mail: katsev@mail.ru*

Изучено взаимодействие липополисахаридов (эндотоксинов) бактерий *S. minnesota* и *E. coli* K235 с полимиксином В. Кинетические исследования проводили с использованием биолюминесцентного метода, основанного на измерении интенсивности свечения морских тест-бактерий в зависимости от концентрации ингибитора. В работе использовали штамм *Photobacterium leiognathi* Sh1, выделенный из вод Азовского моря автором. Показано, что при связывании липополисахаридов с антибиотиком ингибиторные свойства последнего снижаются, что выражается в восстановлении интенсивности биолюминесцентного сигнала. С использованием такого подхода расчетным и графическим методами определены константы ассоциации полимиксина и липополисахарида, которые варьировали в пределах  $4,77 \cdot 10^6 - 1,81 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ . Анализ литературных данных показал, что полученные значения констант совпадают с данными других физико-химических методов.

**Ключевые слова:** люминесцентные бактерии, липополисахарид, полимиксин.

### ВВЕДЕНИЕ

Липополисахарид (ЛПС, эндотоксин) – термостабильный компонент наружной части клеточной мембраны всех грамотрицательных микроорганизмов. Он обеспечивает структурную целостность бактериальной клетки и защищает мембрану от агрессивных воздействий окружающей среды. Макромолекулы ЛПС включают три ковалентно связанных компонента: липид А; центральный олигосахарид и О-антиген. Липид А, самый консервативный элемент ЛПС, обеспечивает связь молекулы с бактериальной мембраной. После разрушения бактериальной клетки липид А высвобождается в кровь и может вызывать тяжёлые токсические последствия. Бактериальные ЛПС являются основной причиной сепсиса, а присутствие их следов в воде или лекарственных препаратах, в особенности для парентерального введения, могут обуславливать пирогенный и другие биологические эффекты [1, 2].

Действие многих антибиотиков, активных против грамотрицательных бактерий, направлено на нейтрализацию или повреждение ЛПС. Одним из таких лекарственных средств является полимиксин (ПмВ), антибиотик полипептидной природы, высокоспецифично взаимодействующий с ЛПС и нейтрализующий его токсические свойства. Связывание ПмВ с ЛПС достаточно хорошо изучено с применением различных физико-химических методов, что отражено в работах [1, 3, 4].

Целью данной работы было изучение количественного взаимодействия ЛПС с ПмВ с использованием нового бактериального биолюминесцентного метода.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения кинетических исследований взаимодействия ПмВ с ЛПС использовали биолюминесцентный метод, основанный на использовании морских светящихся тест-бактерий *Photobacterium leiognathi* Sh1, выделенных из вод Азовского моря [5]. Общий дизайн эксперимента показан на рис. 1. На первом этапе изучали действие ПмВ на биолюминесценцию светящихся бактерий с установлением временных и концентрационных зависимостей (рис. 1, А). Линейные участки кривых ингибирования использовали в качестве калибровочных зависимостей для нахождения концентрации свободного антибиотика в растворе ( $R^2 > 0,9$ ).

На втором этапе изучали действие ЛПС на светящиеся бактерии, определяя интервалы времени воздействия и концентрации, при которых не происходило ингибирования свечения (рис. 1, Б). Далее, для оценки связывания в кюветках люминометра или в 24-луночных планшетах смешивали ПмВ и ЛПС в присутствии буферного раствора и/или раствора 3% NaCl. Реакционную смесь инкубировали в течение 20–30 мин для установления равновесия, после чего прибавляли суспензию светящихся бактерий. В результате взаимодействия с ЛПС концентрация свободного ПмВ снижалась, что приводило к восстановлению свечения бактерий (рис. 1, В). Полученные данные использовали для определения констант ассоциации ПмВ–ЛПС расчетным и графическим (в координатах Скотчардта) методами.

В работе использовали препараты ЛПС *S. minnesota* (Sigma, USA), а также *E. coli* K235, который получали в лабораторных условиях по методу Вестфала [6].

Измерения биолюминесценции проводили на биолюминометре БЛМ-8801 (СКТБ «Наука», Россия)

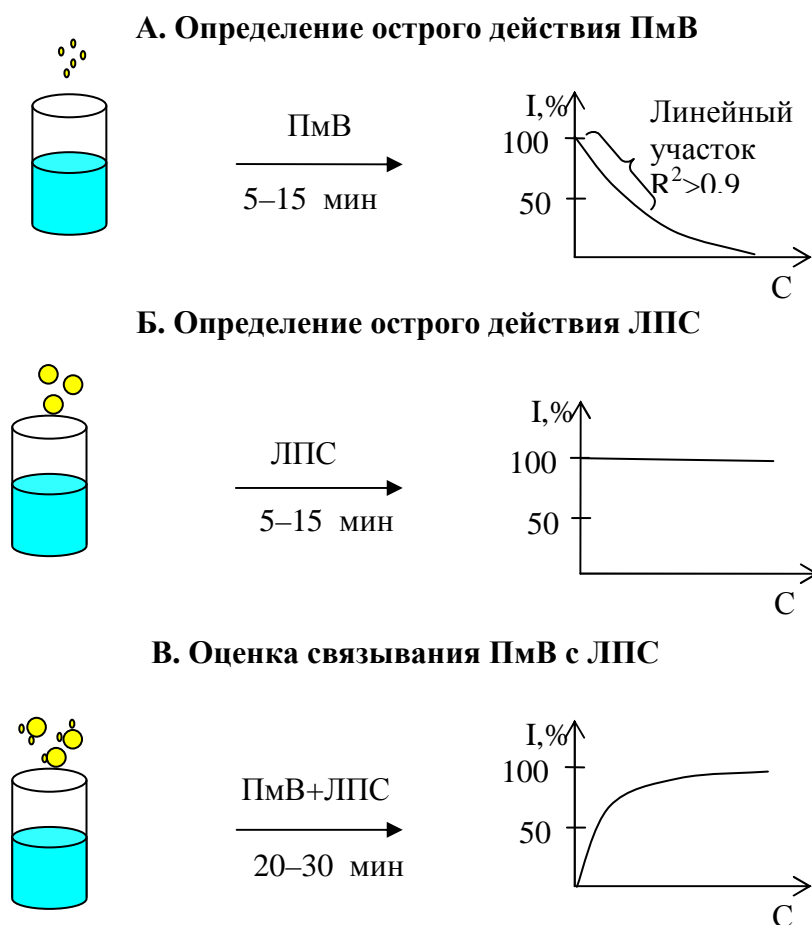


Рис. 1. Методика биолюминесцентного кинетического анализа связывания ПмВ–ЛПС.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как было показано в работах [7, 8], биотестирование с использованием светящихся бактерий может применяться не только для определения токсичности водных сред, но и в качестве кинетического метода для оценки комплексообразования (связывания) веществ – ингибиторов свечения бактерий, с веществами, которые не влияют на их биолюминесценцию. Одной из таких комбинаций может быть пара полимиксин–липолисахарид. Реакция между ними происходит за счет взаимодействия антибиотика с консервативным элементом ЛПС, липидом А, что и приводит к частичной или полной инактивации биологических эффектов эндотоксина [1, 3].

Ранее было показано, что антибиотик ПмВ является сильным ингибитором биолюминесценции с действующей концентрацией  $ЭК_{80}=0,2$  мкг/мл ( $1,67 \cdot 10^{-8}$  моль/л). Связывание ПмВ с ЛПС приводило к снижению его активности,

что сопровождалось восстановлением интенсивности бактериальной люминесценции. Так, если в присутствии ПмВ, через 20 минут биолюминесценция бактерий снижалась до 10%, то внесение ЛПС от 0,3 до 2,6 мкг/мл приводило к восстановлению свечения до 25–78% от контрольных значений [7, 8].

Так как интенсивность свечения бактерий при биотестировании пропорциональна концентрации свободного антибиотика (в линейной области зависимости, рис. 1 А), то использование биолюминесцентного метода дает возможность быстрого определения параметров связывания. Как показано на рис. 2, при увеличении концентрации ПмВ, разность относительных значений биолюминесценции в присутствии и в отсутствии ЛПС возрастает и после достижения максимума снижается. Стадия нарастания связана со снижением антибиотической активности ПмВ при связывании с ЛПС, а фаза спада вызвана нарастанием концентрации свободного антибиотика, после достижения предельного связывания с ЛПС. Таким образом, ЛПС *E. coli* K235 и *S. minnesota* связывают  $8,33 \cdot 10^{-8}$  моль ПмВ на 1 мг ЛПС, независимо от происхождения. Полученное значение является молярным показателем количества липида А в ЛПС, который стехиометрически (1:1) взаимодействует с молекулой антибиотика. Поскольку из-за высокой гетерогенности препаратов ЛПС определить точную величину их молекулярной массы довольно трудно, полученное соотношение связывания было использовано для выражения молярной концентрации ЛПС.

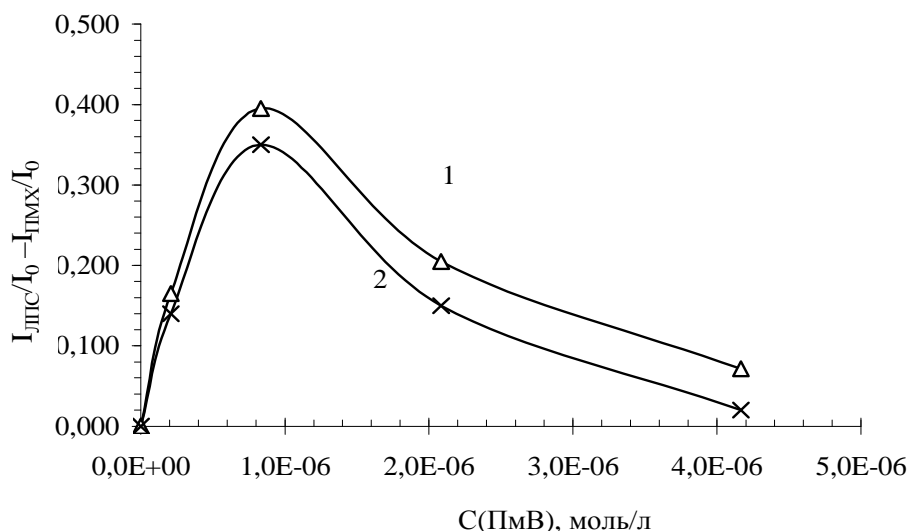


Рис. 2. Зависимость биолюминесценции бактерий от концентрации ПмВ в присутствии липополисахарида: 1 – *E. coli* K235; 2 – *S. minnesota*.

Анализ равновесного связывания ПмВ с ЛПС и определение констант ассоциации проводили расчетным способом (таблица 1 и 2). Равновесные концентрации ПмВ ( $L_p$ ) определяли по интенсивности бактериальной

биолюминесценции (I, %), используя зависимость I от C в качестве калибровочной. Равновесную концентрацию комплекса ЛПС–ПмВ ( $V_p$ ) определяли по формуле:

$$V_p = L_a - L_p,$$

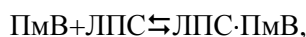
где  $L_a$  – общая концентрация ПмВ.

Равновесную концентрацию ЛПС оценивали как

$$Q_p = Q_a - V_p,$$

где  $Q_a$  – начальная концентрация ЛПС.

Принимая, что взаимодействие ПмВ с ЛПС (липидом А) можно представить в виде уравнения



то константы связывания могут быть рассчитаны по известной формуле закона действующих масс:

$$K_a = \frac{V_p}{L_p \cdot Q_p}$$

Полученные расчетным путем значения  $K_a$  для ЛПС *E. coli* K235 и *S. minnesota* были практически одинаковы и составляли в среднем  $9,86 \cdot 10^6 \pm 3,66 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$  и  $8,72 \cdot 10^6 \pm 6,22 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$  соответственно.

Таблица 1

Расчет констант связывания ( $K_{ac}$ ) ЛПС с ПмВ

Показатели	ЛПС <i>E. coli</i> K235		ЛПС <i>S. minnesota</i>	
$L_a$ (моль/л)	8,33E-08			
I, %	63	85,2	58	92
$L_p$ (моль/л)	5,20E-08	2,08E-08	5,95E-08	1,13E-08
$V_p$ (моль/л)	3,14E-08	6,25E-08	2,38E-08	7,20E-08
$Q_a$ (моль/л)	8,45E-08	4,25E-07	8,50E-08	4,25E-07
$Q_p$ (моль/л)	5,37E-08	3,63E-07	6,12E-08	3,53E-07
$K_a$	<b>1,12E+07</b>	<b>8,30E+06</b>	<b>6,54E+06</b>	<b>1,80E+07</b>
$K_a$ (среднее)	<b><math>9,75 \cdot 10^6 \pm 2,05 \cdot 10^6</math></b>		<b><math>1,23 \cdot 10^7 \pm 8,10 \cdot 10^6</math></b>	
$L_a$ (моль/л)	1,67E-07			
I, %	55	76,7	51,6	76,9
$L_p$ (моль/л)	1,14E-07	5,91E-08	1,32E-07	6,30E-08
$V_p$ (моль/л)	5,25E-08	1,08E-07	3,46E-08	1,04E-07
$Q_a$ (моль/л)	8,45E-08	4,25E-07	8,50E-08	4,25E-07
$Q_p$ (моль/л)	3,25E-08	3,17E-07	5,04E-08	3,21E-07
$K_a$	<b>1,42E+07</b>	<b>5,73E+06</b>	<b>5,21E+06</b>	<b>5,12E+06</b>
$K_a$ (среднее)	<b><math>9,97 \cdot 10^6 \pm 5,99 \cdot 10^6</math></b>		<b><math>5,17 \cdot 10^6 \pm 6,36 \cdot 10^4</math></b>	



Таблица 2  
 Результаты графического метода определения констант связывания ЛПС с ПМВ

Показатель	<i>E. coli</i> K235		<i>S. minnesota</i>	
	1	2	1	2
X ( $L_a$ )	1,25E-07	7,50E-08	1,70E-07	1,10E-07
Y ( $K_a \cdot L_a$ )	2,85	1	0,85	0,5
$K_a$	<b>2,28E+07</b>	<b>1,33E+07</b>	<b>5,00E+06</b>	<b>4,55E+06</b>

Также для определения констант связывания был использован графический метод с представлением результатов в координатах Скотчардта (рис. 3, 4). При этом уравнение закона действующих масс может быть представлено в линейном виде:

$$\frac{B_p}{Q_p} = K_a \cdot L_a - K_a \cdot B_p$$

Построение такой зависимости в координатах  $B_p/Q_p$  от  $B_p$  при разных концентрациях  $L_a$  дает возможность получить значения  $K_a$  по тангенсу угла наклона прямых к оси X (отношение отрезков, отсекаемых прямыми по оси Y и X), таблица 2.

Таким образом, средние значения констант связывания ПМВ с ЛПС *E. coli* K235 и *S. minnesota*, полученные графическим методом составили, соответственно,  $1,81 \cdot 10^7 \pm 6,69 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$  и  $4,77 \cdot 10^6 \pm 3,21 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ , что близко к расчетным результатам (Таблица 1).

Результаты данной работы свидетельствуют о том, что взаимодействие ПМВ с ЛПС *E. coli* K235 и *S. minnesota* происходит практически одинаково. Значения  $K_a$ , определенные с помощью биолюминесцентного метода, практически совпадают с имеющимися в литературе данными, полученными другими методами. Так, по данным калориметрического титрования значения  $K_a$  для различных грамтрицательных бактерий варьировали от  $1,2 \cdot 10^6$  до  $8,53 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$  [1, 3]. Близкие результаты были получены и методом флуоресцентной спектроскопии [1]. Сходные значения параметров ассоциации антибиотика с липополисахаридами различных грамтрицательных бактерий свидетельствуют о том, что связывание ПМВ происходит действительно с самым консервативным элементом эндотоксина – липидом А, который имеет незначительные вариации в зависимости от родовой и видовой принадлежности бактерий [1, 2, 6].

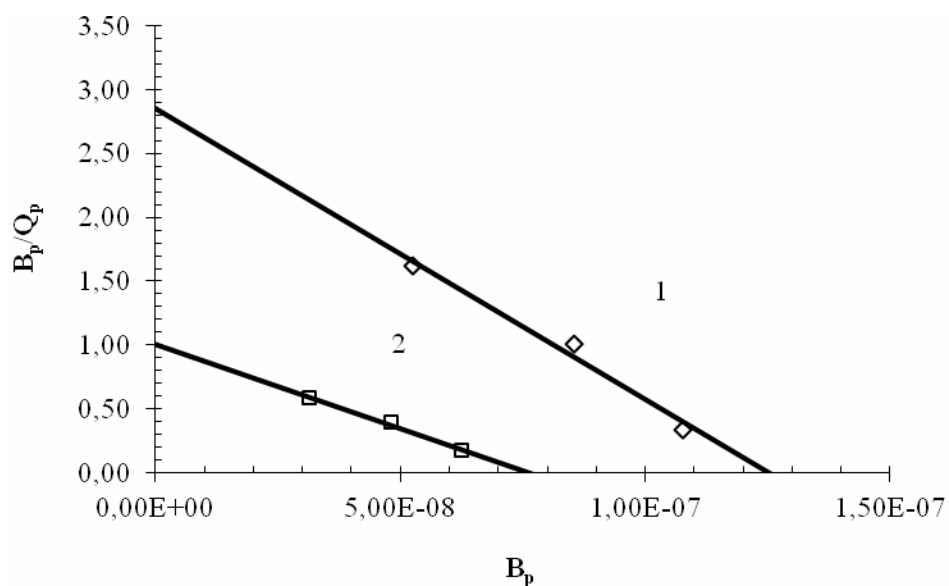


Рис. 3. Анализ связывания ЛПС *E. coli* K235 с ПмВ в координатах Скетчардта при концентрации ПмВ: 1 – 0,2 мкг/мл ( $1,67 \cdot 10^{-7}$  моль/л); 2 – 0,1 мкг/мл ( $8,33 \cdot 10^{-8}$  моль/л).

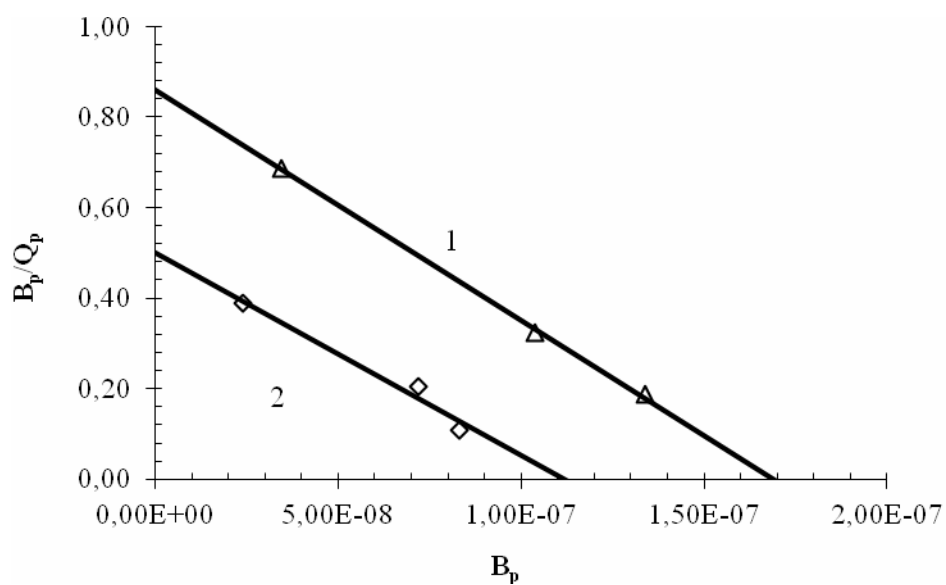


Рис. 4. Анализ связывания ЛПС *S. minnesota* с полимиксином В в координатах Скетчардта при концентрации ПмВ: 1 – 0,2 мкг/мл ( $1,67 \cdot 10^{-7}$  моль/л); 2 – 0,1 мкг/мл ( $8,33 \cdot 10^{-8}$  моль/л).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Изучено взаимодействие полимиксина В с ЛПС *S. minnesota* и *E. coli* K235 с применением нового биолюминесцентного метода.
2. Показано, что в равновесии 1 мг ЛПС, независимо от происхождения, связывает  $8,33 \cdot 10^{-8}$  моль ПмВ.
3. С использованием расчетного и графического методов определены константы ассоциации ПмВ и ЛПС, которые варьировали в пределах  $4,77 \cdot 10^6 - 1,81 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$  и совпадали с имеющимися литературными данными.

### Список литературы

1. Bhor V.M. Polymyxin B: an ode to an old antidote for endotoxic shock / V.M. Bhor, C.J. Thomas, N. Surolia, A. Surolia // *Mol. Biosyst.* – 2005. – Vol. 1, №3. – P. 213–222.
2. Endotoxin-neutralizing capacity of serum from cardiac surgical patients / E. Bennett-Guerrero, G.R. Barclay, P.L. Weng [et al.] // *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* – 2001. – Vol. 15, № 4. – P. 451–454.
3. Srimal S. Titration calorimetric studies to elucidate the specificity of the interactions of polymyxin B with lipopolysaccharides and lipid A / S. Srimal, N. Surolia, S. Balasubramanian, A. Surolia // *Biochem J.* – 1996. – Vol. 315, Pt 2. – P. 679–686.
4. Endotoxin assay by bioluminescence using mutant firefly luciferase / K. Noda, H. Goto, Y. Murakami [et al.] // *Anal. Biochem.* – 2010. – Vol. 397, № 2. – P.152–155.
5. Кацев А. М. Новые термофильные люминесцентные бактерии, выделенные из Азовского моря // *Таврический медико-биологический вестник.* – 2014. – Т. 17, № 2. – С. 59–64.
6. Вестфаль О. Бактериальные липополисахариды / О. Вестфаль, К. Янн // *Методы химии углеводов.* – 1967. – С. 325–332.
7. Биолюминесцентный метод определения липополисахаридов / А. М. Кацев, И. Г. Онучина, А.И. Гордиенко, В. А. Белоглазов // *Таврический медико-биологический вестник.* – 2001. – Т.4, № 1-2. – С. 120–123.
8. Изучение связывания бактериальных липополисахаридов с полимиксином биолюминесцентным методом / А. М. Кацев, И. Г. Онучина, А. И. Гордиенко, В. А. Белоглазов // *Український біохімічний журнал.* – 2002. – Т. 74, № 6. – С. 103–107.

### KINETIC STUDIES OF BACTERIAL LIPOPOLYSACCHARIDES INTERACTION WITH POLYMYXIN BY A BIOLUMINESCENT METHOD

*Katsev A.M.*

*Crimean State Medical University named after S.I. Georgievskiy, Simferopol, Crimea, Russia  
E-mail: katsev@mail.ru*

Lipopolysaccharides (endotoxin), thermostable components of cell outer membrane of Gram-negative organisms, exhibit a wide range of biological functions including toxic properties. A lot of antibiotics active against gram-negative bacteria, are directed to the neutralization or damage of lipopolysaccharides. One of those drugs is a polymyxin, a polypeptide antibiotic, highly specific interacting with endotoxins and counteracting their toxic properties. Thus the aim of this study was a quantitative study of the interaction of lipopolysaccharide with polymyxin B using bacterial bioluminescent method. New marine

luminescent bacteria *Photobacterium leiognathi* Sh1, isolated from the Sea of Azov, was used as a test-strain to study kinetic characteristics of the binding.

Under the action of polymyxin, bioluminescence of test-bacteria was shown to reduce with effective concentration  $EC_{80}=0.2$  mcg/ml ( $1,67 \cdot 10^{-8}$  mol/l). Binding of the antibiotic with lipopolysaccharides resulted in a decrease in its activity and recovery of bacterial luminescence intensity. Endotoxins from *E. coli* K235 and *S. minnesota* were determined to bind the same amount of polymyxin -  $8,33 \cdot 10^{-8}$  mol/mg, regardless of the origin. This value then was used as an indicator of the amount of lipid A of LPS in the determination of association constants ( $K_a$ ) by means of calculation and graphical methods. The calculated  $K_a$  of polymyxin and LPS from *E. coli* K235 and *S. minnesota* were almost the same and averaged  $9,86 \cdot 10^6 \pm 3,66 \cdot 10^6$  M<sup>-1</sup> and  $8,72 \cdot 10^6 \pm 6,22 \cdot 10^6$  M<sup>-1</sup> respectively. The binding constants determined by graphical method were equal to  $1,81 \cdot 10^7 \pm 6,69 \cdot 10^6$  M<sup>-1</sup> and  $4,77 \cdot 10^6 \pm 3,21 \cdot 10^5$  M<sup>-1</sup>.

It was noted that similar values of association constants for polymyxin and lipopolysaccharides from *E. coli* K235 and *S. minnesota* meant that the binding did occur with lipid A, the most conserved element of endotoxins, which has minor variation depending on the genus and the species of bacteria.

**Keywords:** luminescent bacteria, lipopolysaccharide, polymyxin.

#### References

1. Bhor V.M., Thomas C.J., Surolia N., Surolia A. Polymyxin B: an ode to an old antidote for endotoxic shock, *Mol. Biosyst.*, **1**(3), 213 (2005).
2. Bennett-Guerrero E., Barclay G.R., Weng P.L. [et al.] Endotoxin-neutralizing capacity of serum from cardiac surgical patients, *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.*, **15**(4), 451 (2001).
3. S. Srimal, N. Surolia, S. Balasubramanian, A. Surolia Titration calorimetric studies to elucidate the specificity of the interactions of polymyxin B with lipopolysaccharides and lipid A, *Biochem J.*, **315**(2), 679 (1996).
4. Noda K., Goto H., Murakami Y. [et al.] Endotoxin assay by bioluminescence using mutant firefly luciferase, *Anal. Biochem.*, **397**(2), 152 (2010).
5. Katsev A.M. New thermophilic luminescent bacteria isolated from Azov sea, *Tavrisheskiy Mediko-Biologicheskiy Vestnik*, **13**(2), 59 (2014).
6. Westphal O., Jann K. Bacterial lipopolysaccharides, *Methods of carbohydrates chemistry*, **325** (1967).
7. Katsev A.M., Onuchina I.G., Gordienko A.I., Beloglazov V.A. Bioluminescent method for lipopolysaccharides assay, *Tavrisheskiy Mediko-Biologicheskiy Vestnik*, **4**(1-2), 120 (2001).
8. Katsev A.M., Onuchina I.G., Gordienko A.I., Beloglazov V.A. Study of the binding between bacterial lipopolysaccharides and polymyxin by a bioluminescent method, *Ukrainskii biokhimicheskii zhurnal* **74** (6), 103 (2001).

Поступила в редакцию 12.11.2014 г

**УДК 661.183.124**

## **СОРБЦИОННОЕ ИЗВЛЕЧЕНИЕ ИОНОВ СЕРЕБРА(I) ИЗ РАСТВОРОВ МОДИФИЦИРОВАННЫМИ БЕНТОНИТАМИ**

*Крымова В.В.*

*Таврический национальный университет им. В.И.Вернадского, Симферополь, Россия  
E-mail: 777milena@mail.ru*

Исследован процесс адсорбции ионов  $Ag^+$  из растворов на природном сорбенте – бентоните. Получены и исследованы химически модифицированные формы бентонита. Установлено, что модифицирование бентонита моноэтаноламином и тиомочевинной значительно улучшают адсорбционные характеристики бентонита по отношению к ионам  $Ag^+$ .

**Ключевые слова:** адсорбция, ионы серебра, бентонит, тиомочевина, степень извлечения.

### **ВВЕДЕНИЕ**

Сорбционный метод с использованием как природных, так и синтетических сорбентов широко используется для очистки природных и производственных сточных вод от катионов различных металлов. Этот метод позволяет снижать содержание в воде загрязнений органического и неорганического происхождения до любой остаточной концентрации.

Бентониты – природные минералы, сочетающие в себе высокие сорбционные свойства, дешевизну и широкую распространенность в природе. Это делает их экономически целесообразными для сорбционного извлечения и концентрирования ионов цветных и благородных металлов [1]. Модифицирование природных сорбентов комплексообразующими веществами позволяет получать сорбенты с заданными свойствами, повышая их активность и селективность в процессах сорбционного извлечения цветных и благородных металлов.

Целью настоящей работы являлось изучение процессов сорбции ионов серебра(I) из водных растворов бентонитом Крымского месторождения (КМ), а также его модифицированными образцами.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Основным объектом исследований был бентонит Крымского месторождения (Бахчисарайский район, АР Крым). Адсорбцию исследовали из растворов, содержащих ионы  $Ag^+$ . Бентонит КМ входит в группу монтмориллонита, химический состав которого приблизительно отвечает формуле:  $(Na, Ca)_{0,33} (Al, Mg)_2 SiO_4 (OH)_2 \cdot nH_2O$ . Минеральный состав бентонита данного месторождения следующий: монтмориллонит 80–85%, каолинит 10–15%, примеси (слюды, карбонаты, кварц, гидроксиды) 5–10% [2].

Количественное определение ионов  $\text{Ag}^+$  в растворах осуществляли титриметрическим методом Фольгарда [3]. В качестве индикатора для определения точки эквивалентности использовали раствор железоаммонийных квасцов.

В работе также были исследованы модифицированные образцы бентонита КМ. Исходные образцы бентонита перед обработкой веществами-модификаторами высушивались при  $T=100-120^\circ\text{C}$  для удаления физически адсорбированной воды. Модифицирование бентонита КМ проводили самопроизвольной пропиткой бентонитов: а) 1 н. раствором  $\text{HCl}$ ; б) 10% водным раствором моноэтаноламина (МЭА); в) 10% водным раствором тиокарбамида (ТК). Необходимым условием самопроизвольной пропитки является смачивание жидкой фазой поверхности бентонита. После пропитки модифицированные образцы высушивали на воздухе.

Для приготовления растворов с различными концентрациями использовали нитрат серебра  $\text{AgNO}_3$  марки х.ч. Методом разбавления из растворов нитрата серебра были приготовлены модельные растворы катионов  $\text{Ag}^+$  определенной концентрации от 0,1 до 2,0 мг/мл серебра. Адсорбцию ионов  $\text{Ag}^+$  из растворов проводили в статическом режиме при комнатной температуре [4]. Для этого брали 1 г адсорбента и добавляли по 50 мл раствора серебра определенной концентрации от 0,1–2,0 мг/мл серебра. Растворы оставляли на сутки для установления равновесия при данной температуре. В течение этого времени между раствором и сорбентом происходили процессы обмена и сорбция ионов серебра на сорбентах. По истечении 0,5, 1, 2 и 24 часов определяли равновесную концентрацию серебра в растворах по указанной методике.

Величину адсорбции (А) рассчитывали по формуле:

$$A = \frac{(C_0 - C_{\text{равн}}) \cdot V}{m} \quad (1)$$

Где: А – величина адсорбции, (мг/г);

$C_0$  – исходная концентрация ионов  $\text{Ag}^+$ , (мг/мл);

$C_{\text{равн}}$  – равновесная концентрация ионов  $\text{Ag}^+$ , (мг/мл);

m – количество адсорбента, (г);

V – начальный объем, (мл).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ полученных изотерм показывает (рис. 1 а, б ) что через 2 часа адсорбция ионов серебра на чистом бентоните достаточно низкая (5–6 мг/г), тогда как на модифицированных образцах величина адсорбции достигает 30–35 мг/г. Следовательно, скорость адсорбции ионов серебра на модифицированных образцах. Как видно из изотерм адсорбции (рис. 1а, б) через 24 часа величина адсорбции ионов  $\text{Ag}^+$  резко возрастает. Наибольшую адсорбционную активность по отношению к ионам  $\text{Ag}^+$  проявляет образец бентонита, модифицированный ТК ( $A=72$  мг/г) и наименьшую активность проявляет немодифицированный образец бентонита ( $A=45$  мг/г).

намного выше, чем на чистом бентоните.

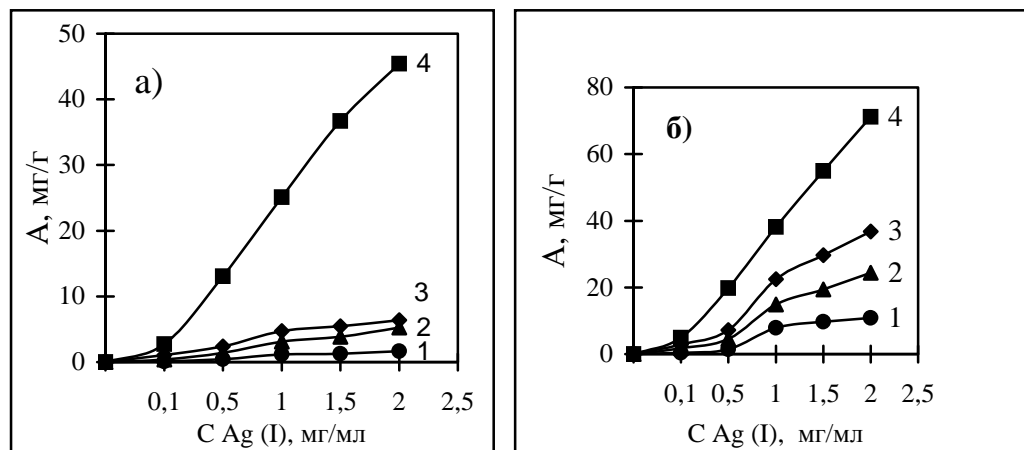


Рис. 1. Изотермы адсорбции ионов  $Ag^+$  из водных растворов в зависимости от исходной концентрации растворов и времени сорбции на сорбентах: а – бентонит КМ; б – бентонит, модифицированный ТК. Кривые: 1 – 0,5 часа; 2 – 1 час; 3 – 2 часа; 4 – 24 часа.

Представляло интерес изучить кинетику процессов адсорбции ионов серебра(I) на природном бентоните КМ, проявившем наименьшую активность и бентоните, модифицированном ТК, проявившем наибольшую активность относительно адсорбции ионов серебра. О скорости процесса адсорбции можно судить по скорости уменьшения концентрации катионов серебра в растворе во времени [5]. По графическим зависимостям, приведенным на рис. 2, можно сделать вывод, что скорость адсорбции на бентоните, модифицированном ТК выше, чем на исходном бентоните.

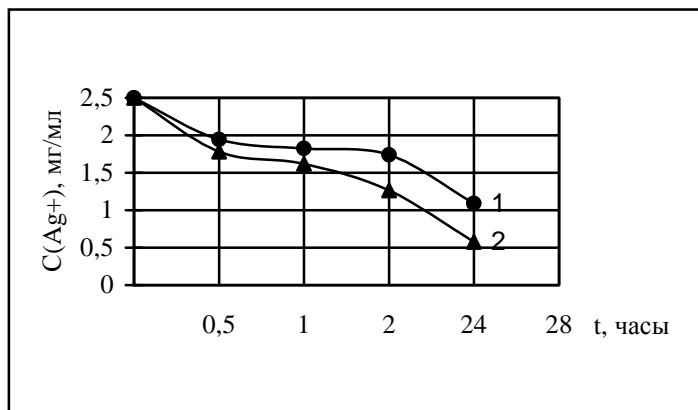


Рис. 2. Изменение концентрации катионов  $Ag^+$  во времени: 1 – бентонит КМ; 2 – бентонит, модифицированный ТК.

Вид зависимости концентрации реагирующего вещества во времени обуславливается порядком реакции [5]. При обработке результатов в координатах  $IgC$  от времени получена линейная зависимость, Следовательно, процесс адсорбции ионов  $Ag^+$  относится к реакциям первого порядка. Константы скоростей, вычисленные графическим методом из соотношения  $k=2,303 \cdot tg\alpha$ , для процесса сорбции на исходном бентоните равна 0,022, а на бентоните, модифицированном ТК – 0,050. Таким образом, скорость извлечения ионов серебра на модифицированном образце в 2,3 раза выше по сравнению со скоростью процесса адсорбции на исходном бентоните. Значения констант скоростей, полученные графическим и расчетным методами практически совпадают.

Анализ изотерм адсорбции позволяет определить несколько важных количественных характеристик сорбента и процесса сорбции: сорбционную емкость (СЕ), коэффициент распределения (D) ионов и степень извлечения (Y) [4]. Коэффициент распределения (D) является наиболее корректной характеристикой процесса сорбции, позволяющий сравнивать между собой различные сорбенты. Результаты определения этих величин приведены в таблице.

**Таблица**

**Физико-химические характеристики процессов адсорбции ионов  $Ag^+$  на бентонитах**

Сорбент	$C(Ag^+)$ мг/мл	Время адсорбции, час	СЕ мг/г	D мл/г	Y, %
Бентонит КМ	0,1	24	2,74	59,41	54,30
	0,5		13,07	54,34	52,08
	1,0		25,08	50,32	50,16
	1,5		36,71	49,37	48,95
	2,0		45,41	45,41	45,41
Бентонит, модифицированный НСІ	0,1	24	3,23	91,24	67,60
	0,5		15,89	87,13	63,54
	1,0		31,30	83,68	61,60
	1,5		39,86	56,72	58,34
	2,0		54,37	59,57	54,35
Бентонит, модифицированный МЭА	0,1	24	3,65	134,51	72,90
	0,5		17,32	112,65	69,26
	1,0		33,53	101,79	67,06
	1,5		47,62	86,96	63,35
	2,0		61,29	79,16	61,29
Бентонит, модифицированный ТК	0,1	24	4,90	223,22	81,70
	0,5		19,77	189,00	79,08
	1,0		38,08	159,64	76,15
	1,5		54,95	136,98	73,26
	2,0		71,19	123,52	71,19



Как видно из таблицы, сорбционная емкость всех образцов увеличивается с увеличением концентрации. Величина СЕ у бентонита, модифицированного ТК, больше, чем у остальных сорбентов. Коэффициент распределения (D) имеет экстремальные значения для всех сорбентов при  $C(\text{Ag}^+) = 0,1$  мг/мл, затем с увеличением концентрации ионов  $\text{Ag}^+$  уменьшается. При этом величины (D) образца, модифицированного ТК, в 2,7–3,8 раза выше, чем у бентонита КМ. Величина (D) образца, обработанного МЭА, в 1,8–2,3 раза выше, а у сорбента, модифицированного HCl, в 1,3–1,7 раза выше, чем у исходного бентонита.

Степень извлечения (Y) (рис. 3), имеет максимальные значения при небольших концентрациях ионов  $\text{Ag}^+$  и уменьшается с увеличением концентрации. Степень извлечения (Y) ионов  $\text{Ag}^+$  бентонитом, модифицированным HCl, в среднем, на 11% выше, у бентонита, модифицированного МЭА на 17% и у бентонита, модифицированного ТК, на 27% выше, чем у исходного бентонита КМ.

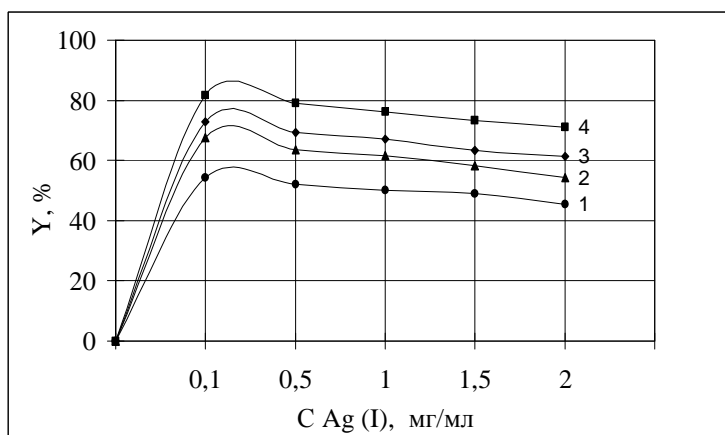


Рис. 3. Зависимость степени извлечения (Y) от исходной концентрации ионов  $\text{Ag}^+$  на сорбентах: 1) бентонит КМ; 2) бентонит, модифицированный HCl; 3) бентонит, модифицированный МЭА; 4) бентонит, модифицированный ТК.

Результаты работы показывают, что по адсорбционной активности в процессах извлечения ионов  $\text{Ag}^+$  из водных растворов изученные сорбенты можно расположить в ряд: Бентонит (КМ) < Бентонит, модифицированный HCl < Бентонит, модифицированный МЭА < Бентонит, модифицированный ТК.

Полученный ряд активности сорбентов при адсорбции ионов  $\text{Ag}^+$  показывает, что улучшение сорбционных свойств бентонитов определяется способом модифицирования и природой веществ – модификаторов. Исходный бентонит КМ подвергался только термической обработке при  $T = 100\text{--}120^\circ\text{C}$  и проявил наименьшую активность в процессе адсорбции ионов  $\text{Ag}^+$ . Повышение адсорбционных свойств бентонита КМ, обработанного соляной кислотой, обусловлено вымыванием поверхностных щелочных и щелочноземельных катионов металлов, увеличением пористости и объемной емкости [6].

МЭА и ТК – это вещества, которые образуют прочные комплексы с ионами серебра(I). Комплексообразующая способность МЭА обусловлена наличием в молекуле спиртовой группы и аминогруппы. Следовательно, повышение сорбционной способности бентонита КМ, модифицированного МЭА, происходит посредством образования комплексов ионов  $Ag^+$  с МЭА.

Из литературы известно [7], что константы устойчивости комплексов ионов  $Ag^+$  с МЭА ниже, чем константы устойчивости с тиокарбамидом. Следовало ожидать, что бентонит, модифицированный ТК, проявит большую активность по сравнению с бентонитом, модифицированным МЭА.

Максимальная адсорбция ионов  $Ag^+$  из растворов бентонитом, модифицированным ТК, происходит вследствие образования комплексов: дитиокарбамида серебра  $Ag[SC(NH_2)]_2^+$  и тритиокарбамида  $Ag[SC(NH_2)]_3^+$ . По данным [8] константа нестойкости тиокарбамидного комплекса  $Ag[SC(NH_2)]_3^+$  равна  $7,24 \cdot 10^{-14}$ , а для комплексного иона  $Ag[SC(NH_2)]_2^+$  –  $K_n = 3,0 \cdot 10^{-11}$ .

Таким образом, повышение сорбционной активности бентонитов, модифицированных МЭА и ТК, обусловлено образованием поверхностных комплексов модификатора с ионами серебра. Полученный ряд активности образцов бентонитов, исследованных в процессах сорбции ионов серебра, подтвержден экспериментальными результатами и литературными данными [8]. Сорбенты, полученные модифицированием бентонита КМ, МЭА и ТК могут использоваться для сорбционного извлечения и концентрирования ионов серебра(I) из водных растворов.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Изучены процессы адсорбции ионов серебра(I) из водных растворов на природном сорбенте бентоните КМ и его модифицированных образцах.
2. Определены кинетические и физико-химические параметры процессов адсорбции ионов серебра(I): константы скорости адсорбции, величины сорбционной емкости (СЕ), коэффициент распределения (D) и степень извлечения (Y) на всех сорбентах.
3. По сорбционной активности по отношению к ионам  $Ag^+$  изученные сорбенты располагаются в следующей последовательности: Бентонит (КМ) < Бентонит, модифицированный HCl < Бентонит, модифицированный МЭА < Бентонит, модифицированный ТК.
4. Установлено, что модифицирование природного бентонита КМ моноэтаноламином (МЭА) и тиокарбамидом (ТК), образующими прочные комплексы с ионами  $Ag^+$ , улучшают сорбционную активность этих образцов по сравнению с немодифицированным бентонитом.

Список литературы

1. Тарасевич Ю.И. Адсорбция на глинистых минералах / И.Ю. Тарасевич. – К.: Наукова думка, 1975. – 352 с.
2. Годовиков А.А. Минералогия / А.А. Годовиков. – М.: Недра, 1983. – 460 с.
3. Калюкова Е.Н. Титриметрические методы анализа: Учебное пособие / Е.Н. Калюкова. – Ульяновск: УлГТУ, 2008. – 108 с.
4. Гриссбах Р. Теория и практика ионного обмена / Р. Гриссбах. – М.: Наука, 1970. – 250с.
5. Байрамов В.М. Основы химической кинетики и катализа: Учеб. пособие / В.М. Байрамов; под ред. В. В. Лунина. – Москва : Academia, 2003 . – 251 с.
6. Композиционные наноматериалы на основе кислотно-активированных монтмориллонитов / В.П. Финевич, Н.А. Аллерт, Т.Р. Карпова, В.К. Дуплякин // Рос. хим. ж. – 2007. – Т.51, №4 - С. 69-76.
7. Кунилова И.В. Использование химически модифицированных природных цеолитов для сорбционного извлечения ионов цветных и благородных металлов из техногенных растворов / И.В. Кунилова, В.Е. Вигдергауз // Проблемы освоения недр в XXI веке глазами молодых. Материалы 3 Межд. науч. школы молодых ученых и специалистов. 27-30 ноября 2006 г. – М.: ИПКОН РАН, 2006. – С. 15-18.
8. Козин Л.Ф. Кинетика растворения серебра в растворах тиокарбамида / Л.Ф. Козин, А.К. Богданова // Теорет. и эксперим. химия. – 2001. – Т.37, № 4. – С. 251-255.

**SORPTION OF SILVER(I) IONS FROM AQUEOUS SOLUTIONS BY MODIFIED BENTONITES**

*Krymova V.V.*

*Taurida V.I. Vernadsky National University, Simferopol, Ukraine  
E-mail: 777milena@mail.ru*

Modification of natural sorbents by complexing agents produces sorbents with desired properties, enhancing their activity and selectivity in the process of sorption of non-ferrous and precious metals. The aim of this work was to study the sorption of ions of silver(I) from aqueous solutions by the Crimean bentonite and its modified samples.

Modification of bentonite was performed by spontaneous impregnation of the bentonites with: a) 1N HCl solution; b) 10% aqueous solution of monoethanolamine; c) 10% aqueous solution of thiocarbamide. A prerequisite of this process is the impregnation of the bentonite surface with liquid phase. After impregnation the modified samples were dried in air.

The work investigated the adsorption of silver(I) ions from aqueous solutions by natural bentonite sorbent and its modified samples. The kinetic and physicochemical parameters of adsorption of silver(I) ions: the rate constant of adsorption, sorption capacity value, the distribution coefficient and the recovery rate for all sorbents.

By sorption activity with respect to Ag<sup>+</sup> ions the studied sorbents are arranged as follows: Bentonite < Bentonite modified with HCl < Bentonite modified with monoethanolamine < Bentonite, modified with thiocarbamide. It was established that the modification of the natural bentonite by monoethanolamine and thiocarbamide, forming

stable complexes with the ions  $\text{Ag}^+$ , to improve the adsorption activity of these samples as compared to unmodified bentonite.

**Keywords:** adsorption, silver ions, bentonite, thiocarbamide, recovery rate.

#### References

1. Tarasevich Y.I., Adsorption on clay minerals, 352 p. (Naukova Dumka, Kiev, 1975). (in Russ.).
2. Godovikov A.A., Mineralogy, 460 p. (Nedra, Moscow, 1983). (in Russ.).
3. Kalyukova E.N. Titrimetric methods of analysis: Textbook, 108 p. (UlSTU, Ulyanovsk, 2008). (in Russ.).
4. Grissbah R., Theory and practice of ion exchange, 250 p. (Nauka, Moscow, 1970). (in Russ.).
5. Bayramov V.M., Fundamentals of Chemical Kinetics and Catalysis: Proc. Manual, 251 p. (Academia, Moscow, 2003). (in Russ.).
6. Finevich V.P., Allert N.A., Karpov T.R., Duplyakin V.K., Composite nanomaterials based on acid-activated montmorillonite // Russian Chemical Journal, **51**(4), 69 (2007). (in Russ.).
7. Kunilova I.V., The use of chemically modified natural zeolites for sorption of ions of nonferrous and precious metals from industrial solutions, Problems of development of mineral resources in the XXI century through the eyes of the young. Materials 3 Int. scientific school of young scientists and specialists, 27–30 November 2006, P. 15–18 (IPKON RAS, Moscow, 2006). (in Russ.).
8. Kozin L.F. The kinetics of dissolution of silver in solutions of thiourea, Teor. and experimental Chemistry, 37(4), 251 (2001). (in Russ.).

*Поступила в редакцию 06.11.2014 г*

**УДК 541.64:547.466**

## **ХИМОТРИПСИН – СТАБИЛИЗАТОР НАНОЧАСТИЦ СЕЛЕНА**

*Панов Д.А., Пысларь Е.В.*

*Таврический национальный университет имени В.И. Вернадского, Симферополь, Россия  
E-mail: panovda@crimea.edu*

Синтезированы водорастворимые наночастицы селена в присутствии протеолитического фермента  $\alpha$ -химотрипсина в качестве стабилизатора. Особенностью получения нанокompозита является переход селена из ионизированной окисленной формы в молекулярное состояние путем взаимодействия водного раствора селенита натрия с цистеином в щелочной среде. Спектрофотометрическим методом изучены зависимость агрегативной устойчивости полученного нанокompозита от массового соотношения селен–фермент и времени хранения растворов.

**Ключевые слова:** химотрипсин, цистеин, наночастицы, селенит натрия, спектрофотометрия.

### **ВВЕДЕНИЕ**

Создание композитов биогенных элементов является перспективным направлением нанобиотехнологии. В последние годы возрастает интерес к микроэлементу селену, который входит в состав антиоксидантной системы защиты организма. В отличие от ионных форм наноразмерный селен (Se) менее токсичен и обладает повышенной биодоступностью, причем он не только предотвращает, но и приостанавливает развитие злокачественных опухолей. Наночастицы селена, в отличие от антибиотиков, способны оказывать свое действие постоянно [1, 2]. Однако их целенаправленное использование связано с гарантированной агрегативной устойчивостью в течение длительного времени. Валуева С.В. [3, 4] с сотрудниками изучали процессы формирования наноселена при восстановлении селенистой кислоты аскорбиновой кислотой в присутствии ряда синтетических высокомолекулярных соединений (поливинилпирролидон, оксиэтилцеллюлоза, полиметокриловая кислота и др.). В растворе полимера при pH 3,3 в зависимости от массового соотношения селен/полимер в интервале от 0,01–0,2 формируется агрегативно устойчивые наночастицы красного аморфного селена с радиусом 0,57 нм и формой близкой к сферической.

В настоящее время для стабилизации наночастиц селена, полученных ранее описанным методом, используют протеолитический фермент  $\alpha$ -химотрипсин (ХТ). Однако, этот фермент достаточно активен в интервале pH 7,6–8,2. Восстановление селена из селенистой кислоты протекает при pH 2,8–3,5. В интервале pH 4,0–6,5 образующиеся наночастицы быстро агрегируются и выпадают в осадок. И только при pH > 6,5 образуется водорастворимый нанокompозит селена с химотрипсином [5–7].

В работах [8–10] рассмотрен синтез наночастиц селена путем восстановления селенита натрия аминокислотой L-цистеином (Cys), которая входит в состав химотрипсина (рН 7,5–8,5). В отсутствие полимера-стабилизатора полученные наночастицы селена диаметром до 100 нм обладают весьма низкой агрегативной устойчивостью.

Целью данной работы явилось изучение влияния химотрипсина на стабильность частиц наноселена, полученных путем восстановления селенита натрия цистеином в щелочной среде.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы L-цистеин, производства «Synex Pharma»,  $\alpha$ -химотрипсин («ООО и Самсон-Мед») и селенит натрия (х.ч.). Растворы L-цистеина нестойкие, окисляются кислородом воздуха с выпадением осадка (цистин). Водные растворы селенита натрия малоустойчивы. Растворы цистеина и селенита натрия пригодны для работы в день приготовления.  $\alpha$ -Химотрипсин – протеолитический фермент представляет собой чешуйки или белый порошок хорошо растворимый в воде. Молекулярный вес 25 кДа, изоэлектрическая точка наблюдается при рН 8,6.

Для измерения рН растворов использовали универсальный иономер ЭВ-74 со стеклянным индикаторным электродом и хлорсеребряным электродом сравнения. Измерение оптической плотности растворов индивидуальных веществ и нанокомпозитов селена с химотрипсином проводили на спектрофотометре СФ-2000 (Россия) в кварцевых кюветах ( $l=1$  см) при температуре 23 °С в интервале длин волн 200–600 нм. Контроль за агрегативной устойчивостью полученного наноселена осуществляли фотометрическим методом по изменению оптической плотности полосы поглощения при длине волны 315 нм на фотокориметре КФК-2.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Объектами исследования служили селеносодержащие наноструктуры, получаемые восстановлением селенита натрия цистеином в присутствии стабилизатора химотрипсина. Наночастицы селена получали следующим образом: к раствору химотрипсина с концентрацией 0,005–0,25% добавляли раствор селенита натрия с постоянной концентрацией селена 0,005%, перемешивали на магнитной мешалке в течение 30 мин., затем в колбу вводили восстановитель – цистеин и снова перемешивали. Селенит натрия взаимодействует с цистеином в соотношении 1:4. В результате реакции образуется красновато-оранжевого цвета аморфный наноселен. На рис. 1 представлены спектры поглощения: химотрипсина и нанокомпозита селена в присутствии химотрипсина, в области длин волн 200–600 нм. Растворы селенита натрия и цистеина практически не поглощают в области 200–600 нм. Максимум полосы поглощения химотрипсина наблюдается при длине волны 290 нм. Из литературных данных известно, что максимум полосы поглощения аморфного наноселена расположен в области 300–320 нм, поэтому при измерении оптической плотности раствора нанокомпозита селена с химотрипсином в качестве раствора сравнения использовали раствор чистого химотрипсина. Интенсивный максимум поглощения нанокомпозита наблюдался при длине волны

305 нм, что свидетельствует о существовании селена в этом растворе в нуль-валентном состоянии [3].

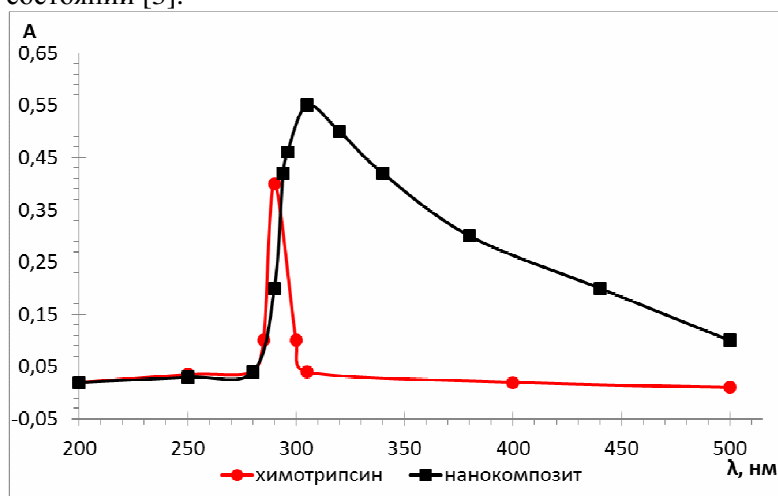


Рис. 1. Зависимость оптической плотности растворов химотрипсина ( $C = 0,005\%$ ), наноккомпозита селена с химотрипсином ( $C_{Se}/C_{ХТ}=0,1$ ) от длины волны.

На процесс формирования и стабильность наноструктур существенное влияние оказывает массовое соотношение компонентов наноккомпозита селен-химотрипсин ( $v=C_{Se}/C_{ХТ}$ ). Были приготовлены ряд растворов при различных массовых соотношениях селен/фермент, равных: 0,02; 0,04; 0,08; 0,10; 0,50; 1,00. Концентрация селена выдерживалась постоянной во всех случаях и составляла 0,005%, а менялась концентрация фермента. Затем измеряли оптическую плотность полученных растворов в области длин волн 200–600 нм (Рис. 2).

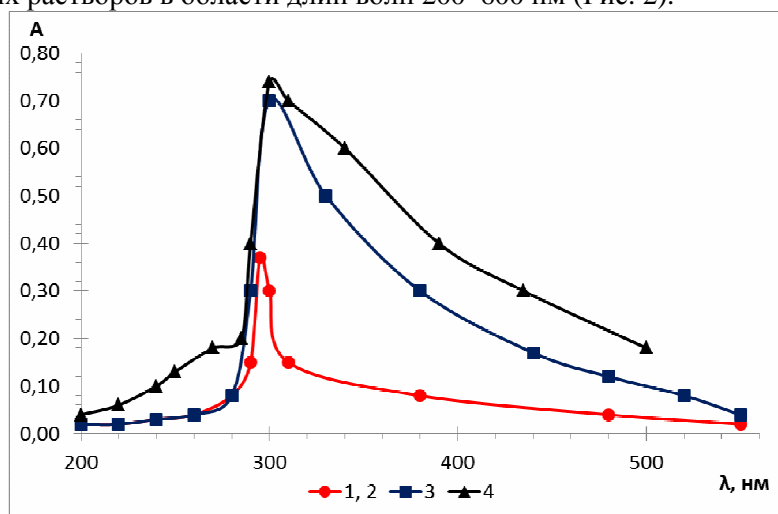


Рис. 2. Изменение оптической плотности селеносодержащих композитов в присутствии химотрипсина в зависимости от длины волны.

Из рис. 2 видно, что максимальная оптическая плотность наблюдается для растворов с массовым соотношением  $\nu(C_{Se}/C_{ХТ})=0,1$  (Рис. 2, кривая 3). Аналогичная картина наблюдается в интервале  $\nu=0,1-1,0$ . Для сравнения был снят спектр поглощения восстановленного наноселена в отсутствие химотрипсина (Рис. 2, кривая 4). При соотношении  $\nu(C_{Se}/C_{ХТ})=0,02-0,08$  наблюдается неполное восстановление селенита натрия цистеином в присутствии химотрипсина.

Агрегативную устойчивость образующихся наночастиц селена в присутствии химотрипсина определяли по изменению оптической плотности и рН растворов. Измерение оптической плотности проводили на фотоколориметре КФК-2 при длине волны 315 нм через определенные промежутки времени в течение двух месяцев. Параллельно в этих же растворах определяли рН. В результате проведенных исследований было установлено, что в течение данного периода наблюдалось стабильное состояние наноконструкций селена с химотрипсином при соотношении 0,1–1,0. «Защитное действие» химотрипсина связано с его адсорбцией на поверхности наночастиц селена и, соответственно, с гидрофилизацией их поверхности за счет ионизированных групп белка, а гидрофильные коллоиды намного стабильнее в водных растворах.

В последние годы развивается новый подход к получению терапевтических препаратов, основанных на иммобилизации лекарственных средств на полимерных носителях. Модифицированные препараты обладают рядом преимуществ по сравнению с нативными предшественниками. В ряде работ [11, 12] гидролитический фермент химотрипсин был иммобилизован наночастицами селена, полученными путем восстановления селенистой кислоты аскорбиновой кислотой при рН 2,8–3,3 с дальнейшим подщелачиванием раствора. Следовательно, предложенный метод получения наноселена путем восстановления селенита натрия цистеином в щелочной среде может быть использован для иммобилизации фермента химотрипсина. Таким образом, разработанный способ получения водорастворимых наноконструкций селена в матрице химотрипсина может быть положен в основу создания новых безопасных и эффективных медицинских и ветеринарных препаратов.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Изучено восстановление селенита натрия цистеином в присутствии стабилизатора – химотрипсина в щелочной среде.
2. Спектрофотометрическим методом установлено, что наибольшая агрегативная устойчивость наноконструкций селена с химотрипсином наблюдается при соотношении  $\nu(C_{Se}/C_{ХТ})=0,1-1,0$ .
3. В присутствии химотрипсина наночастицы селена сохраняли свою агрегативную устойчивость в течение двух месяцев.

#### Список литературы

1. Решетняк Л.А. Селен и здоровье человека (обзор литературы) / Л.А. Решетняк, Е.О. Парфенова // Экология моря. – 2000. – № 59. – С. 20–25.
2. Селен. Некоторые аспекты химии, экологии и участия в развитии патологии (обзор) /



- В.В. Вапиров, М.Э. Шубина, Н.В. Вапирова [и др.]. – Петрозаводск: ПетрГУ, 2000. – 68 с.
3. Самоорганизация и структура селеносодержащих биологически активных наночастиц / С.В. Валуева, Т.Е. Суханова, Л.Н. Боровикова [и др.] // Электр. жур. «Структура и динамика молекулярных систем». – 2011. – № 10 А. – С. 3–11.
  4. Валуева С.В. Влияние соотношения компонентов комплекса селен: поливинилпирролидон на формирование и морфологические характеристики наноструктур / С.В. Валуева, Л.Н. Боровикова, А.И. Киппер // Журнал физической химии. – 2008. – Т. 82, № 6. – С. 1131–1136.
  5. Влияние условий синтеза и pH среды на размерные характеристики наноконплексов селена с химотрипсином / Д.Ю. Ершов, А.И. Киппер, Л.Н. Боровикова [и др.] // Журнал физической химии. – 2013. – Т. 87, № 12. – С. 2116–2118.
  6. Стабилизация наночастиц селена химотрипсином, влияние pH и концентрационного соотношения частица-фермент наноконплексов / Л.Н. Боровикова, А.В. Титова, Н.А. Матвеева [и др.] // Журнал физической химии. – 2013. – Т. 87, № 6. – С. 1009–1012.
  7. Ферментативные и бактерицидные свойства комплексов химотрипсина с наночастицами серебра / Д.Ю. Ершов, Т.М. Ворошилова, А.С. Плешков [и др.] // Шестая всероссийская Каргинская конференция «Полимеры-2014»: [Сборник тезисов, 27–31 января 2014 г.]. – Москва (Россия), 2014. Т. 2, ч. 1. – С. 490.
  8. Facile and controllable one-step fabrication of selenium nanoparticles assisted by L-cysteine / Q. Li, T. Chen, F. Yang [et al.] // Materials letters. – 2010. – Vol. 64, № 5. – P. 614–617.
  9. Пат. 84626 МПК6 А 61 К 33/38, А 61 К 31/00. Спосіб отримання водорозчинної композиції наночастинок, яка містить наночастинки селену / Юркова І.М., Панова Е.П., Панов Д.О., Омельченко О.В.; заявитель и патентообладатель Таврический национальный университет. – № 201305453 ; заявл. 26.04.13 ; опубл. 25.10.13. Бюл. № 20.
  10. Панова Э.П. Исследование взаимодействия селенита натрия с L-цистеином потенциометрическим методом / Э.П. Панова, А.А. Османова // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия: "Биология, химия". – 2014. – Т. 27(66), № 1. – С. 292–298.
  11. Модификация химотрипсина наночастицами селена / Л.Н. Боровикова, Н.Н. Матвеева, К.В. Титова [и др.] // V Всероссийская научная конференция «Физикохимия процессов переработки полимеров. Полимер-2013»: [Тезисы докладов, 16–19 сентября 2013 г.]. – Иваново (Россия), 2013. – С. 77.
  12. Валуева С.В. модификация полиэлектролитных комплексов наночастицами селена / С.В. Валуева, Л.Н. Боровикова, Т.Е. Суханова // V Всероссийская научная конференция «Физикохимия процессов переработки полимеров. Полимер-2013»: [Тезисы докладов, 16–19 сентября 2013 г.]. – Иваново (Россия), 2013. – С. 80–81.

## **CHYMOTRYPSIN - STABILIZER OF SELENIUM NANOPARTICLES**

*Panov D.A., Pyslar E.V.*

*Taurida National V.I. Vernadsky University, Simferopol, Crimea, Russia  
E-mail: panovda@crimea.edu*

The creation of biogenic elements composites is a promising direction of nanobiotechnology. Unlike ionic forms nanosize selenium (Se) is less toxic and has an increased bioavailability, and it not only prevents but also suspends development of malignant tumors.

To stabilize the selenium nanoparticles, using a number of synthetic macromolecular compounds at pH 3.3. However, the use of a proteolytic enzyme  $\alpha$ -chymotrypsin (CT), the

synthesis can be carried out at  $\text{pH} > 6.5$  at the same time produce the aggregation stable soluble nanocomposites selenium with chymotrypsin.

The purpose of this work was to study the effect of chymotrypsin on the stability of nanoselenium obtained by reduction of sodium selenite with cysteine in alkaline medium.

Selenium nanoparticles obtained by mixing together solutions of chymotrypsin ( $C = 0,005\text{--}0,25\%$ ), sodium selenite at a constant concentration of 0.005% selenium, and adding, after 30 min., a reductant – cysteine. Sodium selenite reacts with cysteine in the ratio 1:4. The reaction produced a reddish-orange amorphous nanoselenium. Intensive absorption maximum of nanocomposite observed at a wavelength of 305 nm, which indicates the existence of selenium in the solution in the zero-valent state.

On process of formation and stability nanostructures is significantly affected by the weight ratio of the nanocomposite components selenium-chymotrypsin ( $\nu = C_{\text{Se}}/C_{\text{CT}}$ ). At a ratio of  $\nu(C_{\text{Se}}/C_{\text{CT}}) = 0.1\text{--}1.0$  has the highest aggregate stability of nanocomposites selenium with chymotrypsin.

Determination of aggregate stability during prolonged storage solutions was determined by the change in optical density and the pH of solutions over two months. In this period there was a stable state nanocomposites selenium with chymotrypsin at a ratio  $\nu(C_{\text{Se}}/C_{\text{CT}}) = 0,1\text{--}1,0$ .

A method for producing water soluble selenium nanocomposites in the matrix of chymotrypsin can be used as a basis to create new safe and effective medical and veterinary drugs was designed. In addition, the resulting nanoselenium in alkaline medium may also be used to immobilize the enzyme chymotrypsin, has several advantages compared to the native precursor

**Keywords:** chymotrypsin, cysteine, sodium selenite, nanoparticles, spectrophotometry.

## Reference

1. Reshetnyak L.A., Parfenov E.O. Selenium and human health (review), *Ecology Sea*, **59**, 20 (2000).
2. Vapirov V.V., Shubin M.E., Vapirova N.V., Belichenko V.I., Shubin I.V. *Selenium. Some aspects of the chemistry, ecology, and participation in the development of pathology (review)*, 68 p. (Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, 2000).
3. Valueva S.V., Sukhanov T.E., Borovikova L.N., Vylegzhanina M.E., Matveeva N.A., Gelfond M.L. Self-organization and structure of biologically active selenium nanoparticles, *Structure and dynamics of molecular systems*, **10 (A)**, 3 (2011).
4. Valuev S.V., Borovikova L.N., Kipper A.I. Effect of the ratio of components selenium polyvinylpyrrolidone on the formation and morphological characteristics of nanostructures, *Journal of Physical Chemistry*, **82 (6)**, 1131 (2008).
5. Ershov D.J., Kipper A.I., Borovikova L.N., Pisarev O.A. Influence of the synthesis conditions and pH on the dimensional characteristics of selenium nanocomplexes with chymotrypsin, *Journal of Physical Chemistry*, **(12)**, 2116 (2013).
6. Borovikova L.N. Titova A.V., Matveeva N.A., Pisarev O.A. Stabilization of selenium nanoparticles chymotrypsin: the influence of pH and concentration ratio of nanoparticle-enzyme stability nanocomplexes, *Journal of Physical Chemistry*, **87 (6)**, 1009 (2013).
7. Ershov D.J., Voroshilov T.M., Pleshkov A.C., Kipper A.I., Borovikova L.N., Pisarev O.A., Enzymatic and bactericidal properties chymotrypsin complexes with silver nanoparticles, *Abstracts of Sixth All-Russian Kargin'skaya Conference "Polymers 2014"*, (Moscow, 2014), P. 490.
8. Q. Li, T. Chen, F. Yang, J. Liu, W. Zheng Facile and controllable one-step fabrication of selenium nanoparticles assisted by L-cysteine, *Materials letters*, **64 (5)**, 614 (2010).

9. Jurkova I.M., Panova E.P., Panov D.O., Omelchenko O.V. Pat. 84626 МПК6 А 61 К 33/38, А 61 К 31/00. A process for water-soluble nanoparticles compositions containing selenium nanoparticles / applicant and patenteeTavrida national university. - № 201305453; appl. 26/04/13; publ. 10.25.13. Bull. Number 20.
10. Panova E.P., Osmanova A.A. Study of interaction sodium selenite with l-cysteine by potentiometric method, *Scientific Notes of Taurida National V. I. Vernadsky University – Series: Biology, Chemistry.*, **27** (1), 292 (2014).
11. Borovikova L.N., Matveeva N.A., Titova A.V., Ershov D.J., Pisarev O.A. Modification of selenium nanoparticles chymotrypsin, *Abstracts of V All-Russian Scientific Conference "Physical chemistry of polymer processing. Polymer-2013 "*, Kuleznev V.N. (Ivanovo, 2013), P. 77.
12. Valueva S.V., Borovikova L.N., Sukhanov T.E Modification of polyelectrolyte complexes of selenium nanoparticles, *Abstracts of V All-Russian Scientific Conference "Physical chemistry of polymer processing. Polymer-2013 "*, Kuleznev V.N. (Ivanovo, 2013), P. 80.

*Поступила в редакцию 30.10.2014 г.*

УДК 541.135/135.5

## АНАЛИЗ МАТЕРИАЛОВ ЭЛЕКТРОДОВ ДЛЯ СЕРНОКИСЛОТНЫХ РАСТВОРОВ

*Федоренко А.А., Першина Е.Д., Федоренко А.М.*

*Таврический национальный университет имени В.И. Вернадского, Симферополь, Россия  
E-mail: fedoram37@gmail.com*

Выполнены систематические исследования по выявлению перспективных материалов электродов, предназначенных для проведения электролиза в растворах с  $\text{pH} < 7,0$ . Лучшими показателями оценки материалов для катода являются: перенапряжение выделения водорода на сплавах из металлов, образующих гидриды; удельное электрическое сопротивление металлов, у которых  $\text{nd}$ -орбитали заполнены электронами на 50–90% и имеющие самые низкие значения перенапряжения выделения водорода; ток обмена со значениями ( $10^{-9}$ – $10^{-8}$ ) А/см<sup>2</sup>.

**Ключевые слова:** материалы электродов, электролиз, перенапряжение, ток обмена, рекомбинация, конвективная диффузия.

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящей статье рассмотрены проблемные вопросы технической электрохимии, касающиеся решения ряда практических задач в производстве пигментного диоксида титана сернокислотным способом. К одному из проблемных направлений следует отнести замену «химического» способа восстановления ионов железа(III) до железа(II) и титана(IV) до титана(III) в технологических растворах на электрохимическое восстановление. Необходимость этой замены вызвана тем, что при химическом восстановлении используется металлолом железа и порошкообразный алюминий. Применение металлолома способствует загрязнению технологического раствора хромофорами (ионами Cr, Fe, Co, Ni, Cu, Pb, S и др.), что негативно сказывается на качестве пигмента [1–3]. Однако, при внедрении электрохимического восстановления технологических растворов ранее предложенными способами имеются серьезные проблемы. Во-первых, следует обратить внимание на использование электродов, которые обладают высокой токсичностью (Pb, Hg) и максимальным перенапряжением выделения водорода [4–6]. Во-вторых, электроды подвержены повышенной растворимости в растворах серной кислоты. В других способах при восстановлении титана(IV) используются платиновые электроды [7].

Следовательно, применение электрохимического способа восстановления ионов металлов в технологических растворах, как альтернативного, также нуждается в дополнительных исследованиях с целью повышения выхода по току, снижения затрат электроэнергии и повышения безопасности электролиза. В данном случае необходимо было провести исследования по выявлению материалов для электродов, устойчивых в

растворах с  $pH < 7,0$  и исследование механизма процесса электролиза, протекающего в двойном электрическом слое (ДЭС) [8, 9].

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

С целью выявления перспективных материалов электродов для осуществления электрохимического восстановления технологических растворов производства  $TiO_2$  (пигментного) сернокислотным способом были подвергнуты исследованию следующие материалы: тефлон/углерод (8,0%) – анод; углеродная ткань – анод; стеклоуглерод – (катод, анод); (08X18H10 (AISI-304, сетка) –  $MnO_2$  (n-типа) – анод; титан BT1-00, пластина; свинец (ССу2, пластина) – (катод и анод); нержавеющая сталь 12X18H10T (сетка № 1) – катод; нержавеющая сталь (AISI-304, сетка № 2) – катод; латунь (Л63, сетка) – катод; ОРТА (сетка) – (катод, анод); ниобий (НБР-0, пластина) – катод. Из перечисленных материалов для изготовления катодов и анодов оказались приемлемы нержавеющая сталь (AISI-304, сетка № 2) катод; (08X18H10 (AISI-304, сетка) –  $MnO_2$  (n-типа), анод; ниобий (НБР-0, пластина) катод; титан. Их эффективность установлена при определении перенапряжения выделения водорода ( $\eta$ ) при температурах 15 и 50 °С, максимальной плотности тока при постоянном напряжении, токе обмена ( $i_0$ ), растворимости в 30% серной кислоте (s, %).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение перенапряжения выделения водорода является важной непосредственной мерой необратимости электрохимической реакции выделения водорода (1):  $\eta = E_j - E_H$  [10–12]. Водород на катоде выделяется при потенциале  $E_j$ , который является более негативным, чем обратный потенциал  $E_H$ , что соответствует pH и составу данного раствора (1):

$$E_H = \frac{RT}{F} \ln a_{H^+} = - b_0 pH \quad (1)$$

При отклонении от равновесного потенциала, линейная связь переходит в полулогарифмическую (2):

$$\eta = a + b \lg j \quad (2)$$

Здесь величина  $a$  учитывает влияние материалов электрода на  $\eta$ , однако причина такой зависимости, на наш взгляд, объяснена недостаточно. В монографии А.И. Левина [13] представлена зависимость величины перенапряжения выделения водорода ( $\eta$ , В) от атомного радиуса металла катода, которая также не учитывает энергию взаимодействия иона водорода с участием электрона.

В данном случае следует учесть зависимость удельного электрического сопротивления металла ( $\rho$ , Ом · см) от степени заполнения электронами d- и p-орбиталей атомов. Установлено, что увеличение проводимости металлов зависит от увеличения количества электронов на nd-подуровнях с наличием максимума при 80–90%. Сопоставление результатов  $\rho$  со значениями перенапряжения выделения водорода приводит к хорошему согласованию, которое получено при

математическом определении функциональных зависимостей: по ( $\rho$ )  $F = 62,844 - 12,568 * x + 0,656 * x^2$  и по ( $\eta$ )  $F = 1,418 - 0,236 * x + 0,016 * x^2$ . Отличия в значениях коэффициентов функции по ( $\eta$ ) объясняются тем, что при восстановлении водорода на катоде, его часть адсорбируется и поглощается в виде гидрида с образованием координационной связи М–Н. Для d-подуровня характерно активное заполнение орбиталей до половины подуровня или его полного завершения, чем объясняются «провалы» электронов. Присоединение гидрида на d-орбитали увеличивает количество электронов, тем самым металлы переходят в более токопроводящее состояние. большей частью металлы с водородом образуют гидриды с металлической или переходной связями, обеспечиваемые подвижными электронами, чем определяется их высокая тепло- и электропроводность образованных соединений. Поэтому, как результат описания перенапряжения выделения водорода, на графике наблюдается кривая с большим отрицательным угловым коэффициентом. Подтверждением такого объяснения является поведение ниобия при различных степенях наводораживания, а именно чем больше его наводораживание, тем меньше потенциал перенапряжения выделения водорода [11, 12]. Более подробная информация о поведении ниобия представлена в табл. 2.

Результаты исследований для анализа перенапряжения выделения водорода на металлах в растворах с  $pH < 7$  представлены в табл. 1 и 2.

**Таблица 1**

**Значения оценки поведения материалов при определении перенапряжения выделения водорода**

Параметры	Титан, пластина		Нержавеющая сталь (сетка) № 2		Латунь (сетка)	
	15	50	15	50	15	50
$t$ °С	15	50	15	50	15	50
$a$	-0,376	-0,21	-0,98	-0,87	-1,07	-1,02
$b$	-0,14	-0,133	-0,12	-0,121	-0,12	-0,123
$\alpha$	0,41	0,48	0,48	0,53	0,48	0,52
$i_0$	$2,0 \cdot 10^{-3}$	$2,6 \cdot 10^{-2}$	$6,8 \cdot 10^{-9}$	$6,5 \cdot 10^{-8}$	$1,2 \cdot 10^{-9}$	$5,1 \cdot 10^{-9}$

Информация о кинетических параметрах выделения водорода на ниобии выделена в табл. 2. особо, из-за его специфических свойств по отношению к наводораживанию. Это можно объяснить тем, что металлический Nb по отношению к другим материалам активно взаимодействует с атомарным водородом с образованием гидрида ниобия (NbH) [11].

Таблица 2  
Кинетические параметры выделения водорода на ниобии при  $t = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$

Параметры	Ниобий	Насыщенный водородом ниобий	Ниобий, насыщенный водородом непосредственно перед исследованием
$a$	-1,48	-1,23	-1,07
$b$	-0,10	-0,10	-0,12
$\alpha$	0,59	0,59	0,49
$i_0$	$1,6 \cdot 10^{-15}$	$2,5 \cdot 10^{-13}$	$1,2 \cdot 10^{-9}$

При обобщении результатов исследований, представленных в табл. 1 и 2 мы обнаружили возможность выявления эффективного материала для использования его при восстановлении растворов с пониженным перенапряжением по водороду. Это подтверждается коэффициентом  $a$  уравнения Тафеля (2), значения, которого изменяются от -1,48 (Nb) до -0,376 (Ti). У металла со значением  $a = -1,48$  (Nb) обнаруживается, что материал не наводорожен. Поэтому, в таком состоянии он является менее перспективным, но при наводороживании его до  $i_0 = -1,07$  становится эффективным, материал с  $a = -0,21$  и  $-0,376$  (Ti) активно растворяется в растворах  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , смотреть табл. 3.

Таблица 3  
Ток обмена для разряда ионов  $\text{H}^+$  и  $\text{H}^+-\text{OH}_2$  на различных электродах в водных растворах  $\text{H}_2\text{SO}_4$  [8–12]

Электрод	$i_0, \text{A}/\text{cm}^2$	Электрод	$i_0, \text{A}/\text{cm}^2$
Nb	$1,6 \cdot 10^{-15}$	Сталь AISI 304, $t = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$	$6,5 \cdot 10^{-8}$
Hg	$7,0 \cdot 10^{-13}$	Ag	$1,0 \cdot 10^{-8}$
Nb <sub>(наводорожен за 20 сут. до измерения)</sub>	$2,5 \cdot 10^{-13}$	Латунь, $t = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$	$5,1 \cdot 10^{-9}$
In	$8,0 \cdot 10^{-12}$	Cu	$1,5 \cdot 10^{-7}$
Zn	$5,0 \cdot 10^{-11}$	Au	$3,0 \cdot 10^{-7}$
Bi	$1,0 \cdot 10^{-10}$	Fe	$3,0 \cdot 10^{-6}$
Ga <sub>(ж)</sub>	$3,0 \cdot 10^{-10}$	Ti, $t = 15\text{ }^{\circ}\text{C}$	0,002
Nb <sub>(наводорожен за 5 мин. до измерения)</sub>	$1,2 \cdot 10^{-9}$	Ti, $t = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$	0,026
Латунь, $t = 15\text{ }^{\circ}\text{C}$	$6,8 \cdot 10^{-9}$	Pt	$\geq 0,1$
Сталь AISI 304, $t = 15\text{ }^{\circ}\text{C}$	$6,8 \cdot 10^{-9}$		

При анализе табл. 1–3 обращено внимание на показатели тока обмена, которые активно меняются от  $10^{-15}$  до  $\geq 0,1 \text{ A}/\text{cm}^2$ . Экспериментально установлено, что при учете рекомбинации водорода с заменой молекулярной на конвективную диффузию (с использованием силы Лоренца, NdFeB), лучший выход по току достигается при

$i_0 = (10^{-9} - 10^{-8}) \text{ А/см}^2$  с заполнением элементов электронами nd- и (n+1)p-орбиталей (больших периодов) в пределах 50–90%. Насыщенный водородом ниобий (как сплав) активно понижает перенапряжение выделения водорода из-за образования координационной связи с водородом 4d-орбиталей.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Установлено, что лучшими материалами для катодов являются сплавы из металлов, образующих гидриды и имеющие степень заполнения электронами nd-орбиталей в пределах 50–90%.
2. Выявлено, что перспективным способом определения материалов для катодов в растворах с  $\text{pH} < 7,0$  является ток обмена со значениями  $(10^{-9} - 10^{-8}) \text{ А/см}^2$ .
3. Выявлена функциональная зависимость перенапряжения выделения водорода в растворах с  $\text{pH} < 7$  от степени заполнения nd-подуровня электронами (удельного электрического сопротивления металлов), что также объясняет степень влияния координации гидридов металлов с nd-орбиталями.
4. Ниобий, насыщаемый водородом на поверхности катода и в его глубине, пополнил 4d<sup>4</sup>-орбитали электронами за счет координации H<sup>-</sup> (NbH), что повлияло на степень заполнения электронами орбиталей от 40, как минимум, до 60%.

#### Список литературы

1. Химия и технология редких и рассеянных элементов: Учеб. пособие для вузов 2-е изд., ч. II, перераб. и доп. / И.В. Шахно, З.Н. Шевцова, П.И. Федоров, С.С. Коровин; Под ред. К.А. Большакова – М.: Высш. Школа, 1976. – 360 с.
2. Скомороха В.М. Производство двуокиси титана сульфатным способом. / Скомороха В.М., Заречный В.Г., Воробьева И.П., Вакал С.В. – Сумы.: АТЗТ «Арсенал пресс», 2002. – 204 с.
3. Совместное восстановление ионов Fe (III), Ni (II), Co (II) в растворах при их контакте с алюминием / А.Ф. Дресвянников, М.Е. Колпаков, О.А. Ларина [и др.] Вестник Казанского технологического университета. – 2007. – № 3–4. – 18 – 27.: ISAN 1998-7072.
4. Электрохимическое восстановление железа и титана в растворах сульфата титана / Руковод. научного отчета: Я. Г. Горощенко, Д. П. Зосимович, М. Е. Гиллер. – К.: ИОНХ АН УССР. – 1969. – 37 с.
5. Горощенко Я.Г. Химия титана / Горощенко Я.Г. – К.: Наукова думка, 1970. – 334 с.
6. А.с. 905199 СССР МКИ<sup>3</sup> С 01. G 23/00. Способ получения раствора сульфата трехвалентного титана / В.А.Иоффе, В.А.Тюсуин, С.Я. Корниловских, С.И.Лукшина, Р.И.Садиков (СССР) - № 2895960/23-26; заявл. 20.03.80; опубл. 15.02.82, Бюл. № 6.
7. Руководство по неорганическому синтезу / [Ред. Р. Брауэр]. Т. 4. – М.: Мир, 1985. – 1504 с.
8. Якименко Л.М. Электродные материалы в прикладной электрохимии. / Якименко Л.М. – М.: Химия, 1977. – 264 с.
9. Антропов Л.І. Теоретична електрохімія./ Антропов Л.І. – К.: Либідь, 1993. – 544 с.
10. Дамаскин Б.Б. Электрохимия. / Дамаскин Б.Б., Петрий О.А., Цирлина Г.А. – М.: Химия, Колос, 2006. – 672 с.
11. Федоренко А.А. Дискриминация материалов катодов и анодов для электрохимического синтеза сульфата титана(III) / А.А. Федоренко // Ученые записки ТНУ. – Симферополь: ТНУ. – 2012. – Т. 25(64), №3 – С.316-325.
12. Федоренко А.А. Актуальные вопросы электрохимического восстановления ионов металлов в растворах серной кислоты / А.А. Федоренко // Вісник НТУ «ХПІ». – Харків: НТУ «ХПІ». – 2013. – № 64 (1037). – С. 168 – 175.
13. Левин А.И. Теоретические основы электрохимии. / Левин А.И. – М.: Металлургия, 1972.– 544 с.



## ANALYSIS ELECTRODE MATERIALS SULFURIC ACID SOLUTIONS

*Fedorenko A. A., Pershina K.D., Fedorenko A. M.*

*Taurida V.I. Vernadsky National University, Simferopol, Russia  
E-mail: fedoram37@gmail.com*

Performed a systematic study to identify promising electrode materials intended for electrolysis in solutions with  $\text{pH} < 7.0$ . The best indicators of assessment materials for the cathode is the overvoltage of hydrogen evolution ( $\eta$ , V) alloys of metals (forming hydrides) with atomic. The stated reason in the literature depending on the radius of the metal atoms explained enough, it does not account for the interaction energy of hydrogen ion with an electron. No less important information is the dependence of the electrical resistance of the metal ( $\rho$  Ohms/cm) from the degree of filling of d- and p-orbitals of atoms. It was found that an increase in the electrical conductivity of metals depends on the filling of electrons on nd-sublevels with the appearance of a maximum at 80-90%. Comparison of results ( $\rho$ ) with values ( $\eta$ ) leads to a good agreement, obtained in the mathematical definition of functional dependencies by: ( $\rho$ )  $F = 62,844 - 12,568 * x + 0,656 * x^2$  и по ( $\eta$ )  $F = 1,418 - 0,236 * x + 0,016 * x^2$ . Differences in values of the coefficients for the function ( $\eta$ ) due to the fact that the reduction at the cathode hydrogen is absorbed and a part thereof is absorbed in the form of a hydride to form a coordination bond M-H. Confirmation of this explanation is the behavior of niobium at different degrees of hydrogenation, namely, the more it hydrogenation, the less potential overvoltage of hydrogen evolution.

From experience we know that the current exchange rates ( $i_0$ ,  $\text{A}/\text{cm}^2$ ) actively varies from  $10^{-15}$  to  $\geq 0.1 \text{ A}/\text{cm}^2$ . We have experimentally found that taking into account the recombination of hydrogen with molecular replacement for convective diffusion (using the Lorentz force, NdFeB), the best current output is achieved at  $i_0 = (10^{-9} - 10^{-8}) \text{ A}/\text{cm}^2$  with filling elements electrons nd- and  $(n + 1)p$ -orbitals (longer periods) in the range of 50 - 90%.

**Keywords:** materials of electrodes, electrolysis voltage, current exchange, recombination, convective diffusion.

## Reference

1. Shakhno I.V., Shevtsova Z.N., Fedorov P.I., Korovin S.S., Bolshakov K.A., *Chemistry and technology of rare and dispersed elements*, 2 ed., 360 p. (Vishaya Shkola, Moscow, 1976). (in Russ.)
2. Skomorokha V.M., Zarechnyi V.G., Vorobyev I.P., Vakal S.V., *Production of titanium dioxide sulphate process*, 204 p. (ATZT Arsenal press, 2002). (in Russ.)
3. Dresvyannikov A.F., Kolkakov M.E., Larina O.A., Joint recovery ions Fe (III), Ni (II), Co (II) in the solutions after contact with aluminum, *Vestnik Kazanskogo Universiteta*, 3-4, 18-27p. (2007).
4. Goroshchenko Y.G., Zosimovich D.P., Giller M. E., *Electrochemical reduction of iron and titanium in the titanium sulphate solution*, 334 p. (Naukova Dumka, Kiev, 1970). (in Russ.)
5. Goroshchenko Y.G. *Chemistry of titanium*, 334 p. (Naukova Dumka, Kiev, 1970). (in Russ.)
6. AS 905199 USSR MKI3 From 01. G 23/00. A method of producing a solution of ferric sulfate titanium / V.A.Ioffe, V.A.Tyusuin, SJ Kornilov, S.I.Lukshina, R.I.Sadikov (USSR) - № 2895960 / 23-26; appl. 03/20/80; publ. 02.15.82, Bul. Number 6.
7. Brower R. *Guidelines for inorganic synthesis*, 1504 p. (Mir, Moscow, 1985). (in Russ.)

8. Yakimenko L.M., *Electrode materials in applied electrochemistry*, 264 p. (Himia, Moscow, 1977). (in Russ.)
9. Antropov L.I. *Theoretical electrochemistry*, 544 p. (Lybyd, Kiev, 1993). (in Russ.)
10. Damaskin B.B, Petriy O.I., Tsirlina G.A. *Electrochemistry*, 672 p. (Himia, Moscow, 2006). (in Russ.)
11. Fedorenko A.A. Discrimination cathode and anode materials for electrochemical synthesis titanium sulfate (III), *Scientific notes of TNU*, 25 (64) 316 (2012).
12. Fedorenko AA Topical issues of the electrochemical reduction of metal ions in solutions of sulfuric acid *Vistnik NTU*, 64 (1037) 168 (2013).
13. Levin A.I. *Theoretical foundations of electrochemistry*, 544 p. (Metallurgia, Moscow, 1972). (in Russ.)

*Поступила в редакцию 10.11.2014 г.*

УДК 547.918:547.495.9:547.466.2:543.42

## СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫЕ КОМПЛЕКСЫ МОНОАММОНИЙНОЙ СОЛИ ГЛИЦИРРИЗИНОВОЙ КИСЛОТЫ (ГЛИЦИРАМА) С L-АРГИНИНОМ И ГЛИЦИНОМ

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) с аминокислотами L-аргинином и глицином в водных растворах при pH 7,2. Показано, что глицирам образует с аминокислотами комплексы состава 1:1. Определены константы устойчивости комплексов:  $K_{GC-Arg}=2,72 \cdot 10^4$  и  $K_{GC-Gly}=1,00 \cdot 10^4$  M<sup>-1</sup>. Рассчитаны свободные энергии Гиббса процессов комплексообразования.

**Ключевые слова:** тритерпеновые гликозиды, глицирризиновая кислота, глицирам, L-аргинин, глицин, супрамолекулярный комплекс, спектрофотометрия, константа устойчивости.

### ВВЕДЕНИЕ

Аминокислоты выполняют различные биологические функции и применяются в качестве лекарственных средств. Так, например, глицин (Gly, рис. 1) назначают при нарушениях мозгового кровообращения. Он также используется для лечения алкоголизма и мышечных дистрофий [1]. Аминокислота L-аргинин (Arg, рис. 1) находит применение для лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы, печени и др. [2, 3].

Получены молекулярные комплексы стероидных гликозидов с аминокислотами [4]. При этом было установлено, что стероидные гликозиды не образуют комплексов с Arg, но дают их с Gly. Начато исследование комплексов тритерпеновых гликозидов с различными аминокислотами [5]. Был синтезирован комплекс Gly с  $\alpha$ -хедерином, тритерпеновым гликозидом различных видов плющей [6].

В медицинской практике для лечения аллергии и заболеваний печени используются препараты Stronger Neo-Minophagen C и Glycyron, которые включают моноаммонийную соль глицирризиновой кислоты (глицирам, GC, рис. 1) и Gly [7]. Глицирризиновая кислота (3-O- $\beta$ -D-глюкуронопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\beta$ -D-глюкуронопиранозид глицирретиновой кислоты) является преобладающим тритерпеновым гликозидом корней солодки *Glycyrrhiza glabra* L. [7]. Известно, что глицирризиновая кислота и Arg обладают гепатопротекторным действием [3, 7], и поэтому они входят в состав различных биологически активных композиций. В

частности, пищевая добавка Viusid наряду с глицирризиновой кислотой и Arg включает также и Gly [8].

При этом особенности межмолекулярных взаимодействий GC с Gly и Arg в водных растворах не рассматривались. В настоящей статье приведены результаты спектрофотометрического исследования их молекулярных комплексов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использовали образец GC фирмы Calbiochem (США) без предварительной подготовки.

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 Arg, Gly и GC (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.

Погрешность определения константы устойчивости комплексов  $K$  не превышала 10 %. Расчет  $K$  выполнен при  $\lambda = 258$  нм.

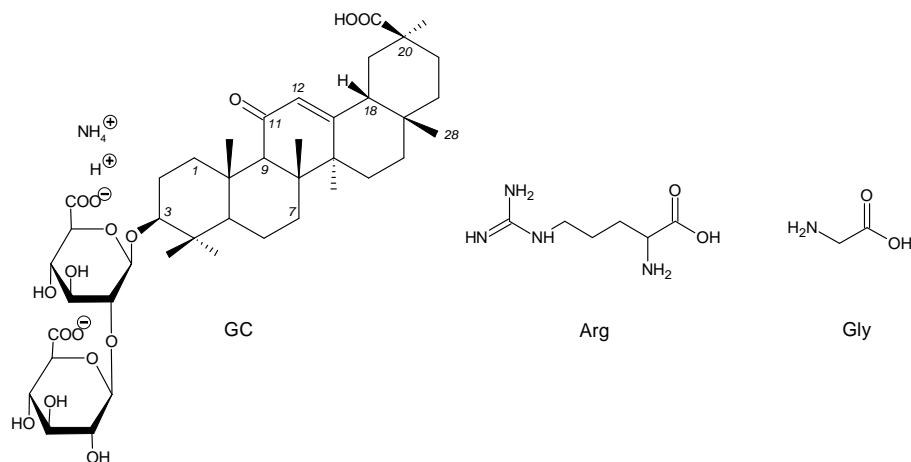


Рис. 1. Моноаммонийная соль глицирризиновой кислоты (глицирам, GC), *L*-аргинин (Arg) и глицин (Gly).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Состав всех комплексов определен методом изомолярных серий (методом Остромысленского–Жоба) [9]. Изомолярные кривые, полученные для смесей GC с аминокислотами Arg и Gly, приведены на Рис. 2 А и 3 А. Для компонентов комплексов получены молярные соотношения  $\approx 1,0$ , которые указывают на состав комплексов, равный 1:1. Комплексы подобного состава были ранее получены для глицирризиновой кислоты и GC с некоторыми биологически активными веществами [10–12].

Спектр поглощения изомолярной серии GC с Arg обладает изобестической точкой при 292 нм (рис. 2 Б), а GC с Gly – при 290 нм (рис. 3 Б). Наличие изобестической точки подтверждает образование только одного типа комплекса между веществами.

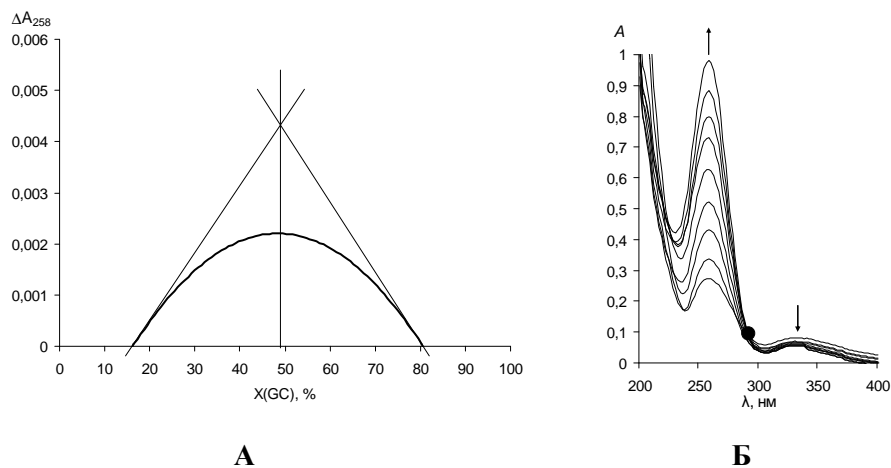


Рис. 2. Зависимость изменения оптической плотности  $\Delta A$  от соотношения компонентов изомолярной серии при  $\lambda=258$  нм ( $c(\text{Arg})=10^{-4}$  М,  $c(\text{GC})=10^{-4}$  М, pH 7,2) (А) и кривые поглощения изомолярной серии растворов ( $c(\text{Arg}) = 10^{-4}$  М,  $c(\text{GC}) = 10^{-4}$  М, pH 7,2) (Б).

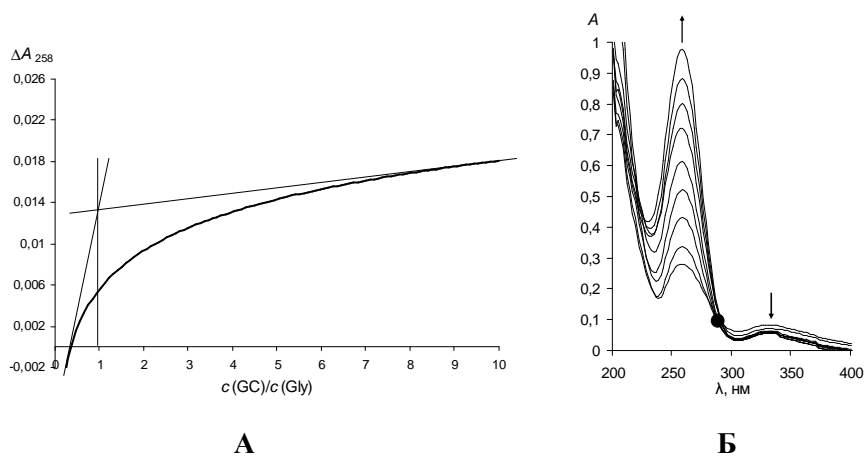
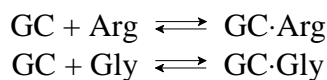


Рис. 3. Зависимость изменения оптической плотности  $\Delta A$  от соотношения компонентов изомолярной серии при  $\lambda=258$  нм ( $c(\text{Gly})=10^{-4}$  М,  $c(\text{GC})=10^{-4}$  М, pH 7,2) (А) и кривые поглощения изомолярной серии растворов ( $c(\text{Gly}) = 10^{-4}$  М,  $c(\text{GC}) = 10^{-4}$  М, pH 7,2) (Б).

Таким образом, в растворах устанавливаются равновесия между GC и аминокислотами вида:



$$K_{\text{GC}\cdot\text{Arg}} = \frac{[\text{GC}\cdot\text{Arg}]}{[\text{GC}][\text{Arg}]}; K_{\text{GC}\cdot\text{Gly}} = \frac{[\text{GC}\cdot\text{Gly}]}{[\text{GC}][\text{Gly}]}, \quad (1)$$

где  $K_{\text{GC}\cdot\text{Arg}}$  и  $K_{\text{GC}\cdot\text{Gly}}$  – константы равновесия, являющиеся константами устойчивости соответствующих комплексов.

На основе изомолярных кривых по формуле 2 были рассчитаны константы устойчивости комплексов  $K$  по методу [13], применимому для комплексов состава 1:1, и приведены в табл. 1.

$$K = \frac{\Delta A_0 \Delta A_1}{c(\Delta A_0 - \Delta A_1)^2}, \quad (2)$$

где  $c$  – суммарная концентрация веществ, равная  $10^{-4}$  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  $\Delta G$  приведены в табл. 1.

$$\Delta G = -2,3RT \lg K. \quad (3)$$

Комплекс GC с Arg оказался примерно в 3 раза более устойчивым, чем комплекс GC с Gly, что, возможно, связано с наличием гуанидиновой группы в молекуле Arg. У ранее полученных комплексов GC с лекарственными веществами, так же имеющих состав 1:1,  $K$  были равны  $10^3$ – $10^5$  М<sup>-1</sup> [10–12].

GC является солью, а аминокислоты существуют в форме цвиттер-ионов. Поэтому при образовании комплексов между ними могут происходить ионные взаимодействия.

**Таблица 1**

**Термодинамические параметры комплексообразования GC с Arg и Gly в водных растворах при 25 °С (рН 7,2)**

Комплекс	$K, \text{M}^{-1}$	$\Delta G, \text{Дж/моль}$
GC·Arg	$2,72 \cdot 10^4$	$-2,53 \cdot 10^4$
GC·Gly	$1,00 \cdot 10^4$	$-2,28 \cdot 10^4$

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Впервые получены комплексы GC с Arg и Gly в водных растворах при pH 7,2. Комплексообразование исследовано спектрофотометрически.
2. Методом изомолярных серий установлено, что супрамолекулярные комплексы GC с аминокислотами Arg и Gly имеют одинаковый состав, равный 1:1.
3. Показано, что  $K_{GC,Arg}=2,72 \cdot 10^4$  и  $K_{GC,Gly}=1,00 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ .

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 14-43-01031 p\_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. Аргинин в медицинской практике (обзор литературы) / Ю.М. Степанов, И.Н. Кононов, А.И. Журбина, А.Ю. Филиппова // Журн. АМН України. – 2004. – Т. 10, № 1. – С. 340–352.
3. Алмакаева Л.Г. Аргинин и его применение в медицине и фармации / Л.Г. Алмакаева, Е.В. Литвинова // Ліки України плюс. – 2011. – № 1. – С. 23–26.
4.  $^{252}\text{Cf}$  Plasma desorption mass spectrometric study of interactions of steroid glycosides with amino acids / V.V. Pilipenko, L.F. Sukhodub, S.A. Aksyonov [et al.] // Rapid Commun. Mass Spectrom. – 2000. – Vol. 14. – P. 819–823.
5. Molecular complexation of ivy saponins with some drugs and biologically active substances / L.A. Yakovishin, V.I. Grishkovets, G. Schroeder, N.I. Borisenko // Functionalized molecules – synthesis, properties and application; ed. V.I. Rybachenko. – Donetsk: Schidnyj vydavnyczyj dim, 2010. – Chapter 4. – P. 85–103.
6. Яковішин Л.О. Молекулярні комплекси тритерпенового глікозиду  $\alpha$ -хедерину з аліфатичними протеїногенними амінокислотами / Л.О. Яковішин, М.А. Рубінсон // Ukr. Bioorg. Acta. – 2009. – Т. 7, № 1. – С. 32–35.
7. Hayashi H. Economic importance of licorice / H. Hayashi, H. Sudo // Plant Biotechnol. – 2009. – Vol. 26. – P. 101–104.
8. Antioxidant and immunomodulatory effects of Viusid in patients with chronic hepatitis C / E.V. Gomez, Y.M. Perez, H.V. Sanchez [et al.] // World J. Gastroenterol. – 2010. – Vol. 16, № 21. – P. 2638–2647.
9. Булатов М.И. Практическое руководство по фотометрическим методам анализа / М.И. Булатов, И.П. Калинин. – [5-е изд.]. – Л.: Химия, 1986. – 432 с.
10. 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.
11. Спектрофотометрія супрамолекулярних комплексів тритерпенових глікозидів плюща і солодцю з левоміцетином (хлорамфеніколом) / Л.О. Яковішин, О.М. Корж, О.Д. Дегтяр, А.В. Клименко // Ukr. Bioorg. Acta. – 2013. – Т. 11, № 1. – С. 33–36.
12. Молекулярные комплексы тритерпеновых гликозидов плюща и солодки с доксорубицином / Л.А. Яковішин, В.И. Гришковец, А.В. Клименко [и др.] // Хим.-фарм. журн. – 2014. – Т. 48, № 6. – С. 37–40.
13. Бабко А.К. Физико-химический анализ комплексных соединений в растворах / А.К. Бабко. – К.: Изд-во АН УССР, 1955. – 328 с.

SUPRAMOLECULAR COMPLEXES OF MONOAMMONIUM  
GLYCYRRHIZINATE (GLYCYRAM) WITH L-ARGININE AND GLYCINE

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

The amino acid glycine (Gly) is prescribed for disorders of cerebral circulation. It is also used for treating alcoholism and muscular dystrophy. Arginine (Arg) is used for the treatment of diseases of the cardiovascular system, liver and other.

In clinical practice for the treatment of allergies and diseases of the liver used drugs Stronger Neo-Minophagen C and Glycyron, which include monoammonium salt of glycyrrhizic acid (glycyram, GC) and Gly. Glycyrrhizic acid (3-O-β-D-glucuronopyranosyl-(1→2)-O-β-D-glucuronopyranoside of 18β-glycyrrhetic acid) is the dominant triterpene glycoside from licorice roots. It is known that glycyrrhizic acid and Arg have hepatoprotective action, so they are a part of various biologically active compositions. In particular, the food supplement Viusid includes glycyrrhizic acid, and also Arg and Gly.

Particular intermolecular interactions of GC with Gly and Arg in aqueous solutions have not been studied. We prepared molecular complexes of GC with amino acids Arg and Gly in aqueous solutions at pH 7,2 (phosphate buffer). Using a method of spectrophotometry, the complexation of GC with amino acids was investigated for the first time. GC forms complexes with Arg and Gly in the 1:1 molar proportion.

Absorption spectra of isomolar series for mixtures of GC with Arg has isobestic point at 292 nm, and with Gly – at 290 nm. The presence of isobestic point is indicates on forming only of one type of complex.

Stability constants for complexes  $K_{GC-Arg}=2,72 \cdot 10^4$  и  $K_{GC-Gly}=1,00 \cdot 10^4$  M<sup>-1</sup> were determined. Gibbs's free energies of complexation processes are calculated.

**Keywords:** triterpene glycosides, glycyrrhizic acid, glycyram, L-arginine, glycine, supramolecular complex, spectrophotometry, stability constant.

Reference

1. Mashkovskii M.D., *Drugs*, 2 vols., 13 ed., 2, 592 p. (Torsing, Kharkov, 1997). (in Russ.).
2. Stepanov Y.M., Kononov I.N., Zhurbina A.I., Filippova A.Y., Arginine in medical practice, *J. AMS Ukraine*, **10** (1), 340 (2004).
3. Almakayeva L.G., Litvinova O.V., An arginine and his application are in medicine and farmacie, *Drugs Ukraine plus*, 1, 23 (2011).
4. Pilipenko V.V., Sukhodub L.F., Aksonov S.A., Kalinkevich A.N., Kintia P.K., <sup>252</sup>Cf Plasma desorption mass spectrometric study of interactions of steroid glycosides with amino acids, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **14**, 819 (2000).
5. Yakovishin L.A., Grishkovets V.I., Schroeder G., Borisenko N.I., Molecular complexation of ivy saponins with some drugs and biologically active substances, in *Functionalized molecules – synthesis, properties and application*, edited by Rybachenko V.I. (Schidnyj vydavnyczyj dim, Donetsk, 2010), 85 p.
6. Yakovishin L.A., Rubinson M.A., Molecular complexes of the triterpene glycoside α-hederine with aliphatic proteinogenous amino acids, *Ukr. Bioorg. Acta*, **7** (1), 32 (2009).



7. Hayashi H., Sudo H., Economic importance of licorice, *Plant Biotechnol.*, **26**, 101 (2009).
8. Gomez E.V., Perez Y.M., Sanchez H.V., Forment G.R., Soler E.A., Bertot L.C., Garcia A.Y., Vazquez M.R.A., Fabian L.G., Antioxidant and immunomodulatory effects of Viusid in patients with chronic hepatitis C, *World J. Gastroenterol.*, **16** (21), 2638 (2010).
9. Bulatov M.I., Kalinkin I.P., *Practical guide of photometric methods of analysis*, 5 ed., 432 p. (Khimiya, Leningrad, 1986). (in Russ.).
10. 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).
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., 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).
13. 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 08.11.2014 г.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

<b>Артова Мария Андреевна</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, магистр кафедры экологии и зоологии
<b>Баттерс Терри Д.</b>	Институт гликобиологии Оксфордского университета, доцент факультета биохимии, заведующий лабораторией химии и биологии ингибиторов – иминосахаров
<b>Белоусова Юлия Виталиевна</b>	Институт биологии южных морей им. А.О.Ковалевского, ведущий инженер отдела экологической паразитологии
<b>Гамма Татьяна Викторовна</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, к.б.н., доцент кафедры физиологии человека и животных и биофизики
<b>Гришковец Владимир Иванович</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, доктор химических наук, профессор кафедры общей и физической химии
<b>Елкина Наталья Маратовна</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, выпускница кафедры биохимии, кандидат биологических наук
<b>Иванова Наталья Николаевна</b>	Никитский ботанический сад-ННЦ, старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии и вирусологии растений, e-mail: natanikivan@yandex.ua
<b>Ивашов Анатолий Васильевич</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, д.б.н., профессор, зав. кафедрой экологии и зоологии
<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>Кириллова Алла Викторовна</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, к.б.н., доцент кафедры физиологии человека и животных и биофизики
<b>Кольхалова Светлана Юрьевна</b>	ГУ «Специализированная медико-санитарная часть №6», врач-лаборант, Днепрпетровск, Украина
<b>Коношенко Светлана Владимировна</b>	Таврический национальный университет имени В.И. Вернадского, профессор кафедры биохимии, доктор биологических наук, e-mail: nataleiolkina@gmail.com
<b>Коренюк Иван Иванович</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, д.б.н., профессор кафедры физиологии человека и животных и биофизики

<b>Корж Елена Николаевна</b>	Севастопольский национальный технический университет, кандидат химических наук, доцент кафедры общей химии
<b>Крымова Валентина Витальевна</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, кандидат химических наук, доцент кафедры общей и физической химии
<b>Минина Елена Николаевна</b>	Таврический Национальный университет им. В.И. Вернадского, кандидат биологических наук, доцент кафедры физической реабилитации и здоровья человека
<b>Митрофанова Ирина Вячеславовна</b>	Никитский ботанический сад – Национальный научный центр, доктор биологических наук, зав. отделом биологии развития и биобезопасности
<b>Нагаева Елена Ивановна</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, к.б.н., доцент кафедры медико-биологических основ физической культуры
<b>Оберемок Владимир Владимирович</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, кандидат биологических наук, ст.преподаватель кафедры биохимии, с.н.с., e-mail: genepcr@mail.ru
<b>Панов Денис Александрович</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, к.х.н., доцент кафедры общей и физической химии, e-mail: panovda@crimea.edu
<b>Панова Светлана Алексеевна</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, к.б.н., доцент кафедры физиологии человека и животных и биофизики
<b>Першина Екатерина Дмитриевна</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, кандидат химических наук, доцент кафедры Общей и физической химии, e-mail: katherinepersh@gmail.com
<b>Письменецкая Ирина Юрьевна</b>	Днепропетровская государственная медицинская академия, доцент кафедры биохимии, медицинской и фармацевтической химии, e-mail: ip01589@gmail.com
<b>Пысларь Елена Владимировна</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, студентка 4 курса кафедры общей и физической химии
<b>Разумейко Владимир Николаевич</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, м.н.с., ассистент кафедры экологии и зоологии
<b>Симчук Андрей Павлович</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, д.б.н., профессор, зав. кафедрой биохимии

<b>Темурьянц Наталья Арменаковна</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, д.б.н., профессор кафедры физиологии человека и животных и биофизики
<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>Федоренко Александр Михайлович</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, доктор химических наук, профессор кафедры Общей и физической химии, e-mail: fedoram37@gmail.com
<b>Федоренко Андрей Александрович</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, младший научный сотрудник НИЧ, e-mail: fedoram37@gmail.com
<b>Хмель Наталья Владимировна</b>	Институт радиофизики и электроники им. А.Я. Усикова НАН Украины, кандидат биологических наук, научный сотрудник отдела «Прикладная биофизика», e-mail: dreval@ire.kharkov.ua
<b>Хусаинов Денис Рашидович</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, к.б.н., доцент кафедры физиологии человека и животных и биофизики
<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>Щербина И.А.</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, студент кафедры физиологии человека и животных и биофизики
<b>Яковишин Леонид Александрович</b>	Севастопольский национальный технический университет, кандидат химических наук, доцент, заведующий кафедрой общей химии, e-mail: chemsevntu@rambler.ru
<b>Янцев Александр Викторович</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, к.б.н., доцент кафедры физиологии человека и животных и биофизики
<b>Ярмолюк Наталья Сергеевна</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, к.б.н., старший преподаватель кафедры медико-биологических основ физической культуры, e-mail: nat_yarm@mail.ru

## СОДЕРЖАНИЕ

### БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

**Артова М.А., Разумейко В.Н., Симчук А.П.**

К ВОПРОСУ О ГЕНЕТИЧЕСКОМ ПОЛИМОРФИЗМЕ ВИДОВ-ДВОЙНИКОВ  
МАЛЯРИЙНЫХ КОМАРОВ КОМПЛЕКСА *ANOPHELES MACULIPENNIS*  
В КРЫМУ .....3

**Елкина Н.М., Коношенко С.В.**

ИЗМЕНЕНИЯ ВНУТРИЭРИТРОЦИТАРНОГО ЛИПИДНОГО СОСТАВА ПРИ  
ЭРИТРЕМИИ И АПЛАСТИЧЕСКОЙ АНЕМИИ ..... 12

**Иванова Н.Н., Митрофанова И.В.**

ОРГАНОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРЕ РАЗЛИЧНЫХ ЭКСПЛАНТОВ ФЕЙХОА В  
УСЛОВИЯХ *IN VITRO*..... 18

**Ивашов А.В., Симчук А.П., Оберемок В.В.**

RAPD-PCR ФРАКЦИИ ДНК КАК МАРКЕРЫ ЖЕСТКОСТИ И ОПУШЕННОСТИ  
ЛИСТЬЕВ ДУБА ПУШИСТОГО И СКАЛЬНОГО .....25

**Кириллова А.В., Янцев А.В., Панова С.А., Щербина И.А.**

ДИНАМИКА ВЫЯВЛЕНИЯ ИНФИЦИРОВАННЫХ БЕШЕНСТВОМ ЖИВОТНЫХ  
В КРЫМУ .....31

**Коренюк И.И., Минина Е.Н., Белоусова Ю.В., Черетаев И.В.**

ВЛИЯНИЕ ДАЛАРГИНА В МАЛЫХ ДОЗАХ НА БОЛЕВУЮ  
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ У КРЫС .....43

**Минина Е.Н.**

ОСОБЕННОСТИ ВЕНТИЛЯЦИОННОГО КОНТРОЛЯ ЮНОШЕЙ 19-20 ЛЕТ С  
РАЗНЫМ УРОВНЕМ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ РЕЗЕРВОВ  
КАРДИОРЕСПИРАТОРНОЙ СИСТЕМЫ .....52

**Панова С.А., Кириллова А.В., Янцев А.В., Нагаева Е.И., Чайка А.В.**

ИЗМЕНЕНИЕ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У ШКОЛЬНИКОВ  
ПОД ВЛИЯНИЕМ РАЗЛИЧНОГО АТМОСФЕРНОГО ДАВЛЕНИЯ .....60

**Pismenetskaya I.U., Kolyhalova S.U., Butters T.D.**

URINARY FREE OLIGOSACCHARIDES OF PATIENTS WITH LEUKAEMIA .....69

**Темурьянц Н.А., Туманянц К.Н., Ярмолюк Н.С., Хусаинов Д.Р., Черетаев И.В.,  
Чайка А.В.**

ЭКЗОГЕННЫЙ МЕЛАТОНИН ВЛИЯЕТ НА ПОЛОВОЕ ПОВЕДЕНИЕ  
КРЫС – САМЦОВ, НАХОДЯЩИХСЯ В УСЛОВИЯХ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО  
ЭКРАНИРОВАНИЯ .....75

**Хмель Н.В.**

ДИЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ ПРОНИЦАЕМОСТЬ И ПОВЕРХНОСТНОЕ НАТЯЖЕНИЕ  
В ОЦЕНКЕ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ .....84

<b>Чертаев И.В., Коренюк И.И, Гамма Т.В., Хусаинов Д.Р.</b> ВЛИЯНИЕ СВЕРХМАЛЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ БЕНЗИМИДАЗОЛА НА ПОВЕДЕНИЕ КРЫС В ТЕСТЕ ПОРСОЛТА В НОРМЕ И НА ФОНЕ АКТИВАЦИИ ДОФАМИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ЮМЕКСОМ .....	93
---	----

## **ХИМИЧЕСКИЕ НАУКИ**

<b>Кацев А.М.</b> КИНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ С ПОЛИМИКСИНОМ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫМ МЕТОДОМ .....	100
<b>Крымова В.В.</b> СОРБЦИОННОЕ ИЗВЛЕЧЕНИЕ ИОНОВ СЕРЕБРА(I) ИЗ РАСТВОРОВ МОДИФИЦИРОВАННЫМИ БЕНТОНИТАМИ .....	109
<b>Панов Д.А., Пысларь Е.В.</b> ХИМОТРИПСИН – СТАБИЛИЗАТОР НАНОЧАСТИЦ СЕЛЕНА.....	117
<b>Федоренко А.А., Першина Е.Д., Федоренко А.М.</b> АНАЛИЗ МАТЕРИАЛОВ ЭЛЕКТРОДОВ ДЛЯ СЕРНОКИСЛОТНЫХ РАСТВОРОВ .....	124
<b>Яковшин Л.А., Гришкowieц В.И., Корж Е.Н.</b> СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫЕ КОМПЛЕКСЫ МОНОАММОНИЙНОЙ СОЛИ ГЛИЦИРРИЗИНОВОЙ КИСЛОТЫ (ГЛИЦИРАМА) С L-АРГИНИНОМ И ГЛИЦИНОМ .....	131
<b>СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ .....</b>	138
<b>СОДЕРЖАНИЕ .....</b>	141