

УЧЕНЫЕ ЗАПИСКИ
КРЫМСКОГО ФЕДЕРАЛЬНОГО
УНИВЕРСИТЕТА имени В. И. ВЕРНАДСКОГО.
БИОЛОГИЯ. ХИМИЯ

Научный журнал

Том 5 (71), № 4

Журнал «Ученые записки Крымского федерального
университета имени В. И. Вернадского. Биология. Химия»
является историческим правопреемником журнала «Ученые записки
Таврического университета», который издается с 1918 г.

**Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского
Симферополь, 2019**

Свидетельство о регистрации СМИ – ПИ № ФС77-61791 от 18 мая 2015 года.
Выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи,
информационных технологий и массовых коммуникаций.

Учредитель – ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского»
Печатается по решению Научно-технического совета Крымского федерального
университета имени В. И. Вернадского, протокол № 7 от 13 сентября 2019 г.

Журнал включен в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы
основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание
ученой степени доктора наук, отрасль науки 03.02.00 – общая биология, 03.03.00 – физиология,
02.00.00 – химические науки, дата включения – 12.07.2017, а также в систему «Российский индекс
научного цитирования» (РИНЦ)

Редакционная коллегия журнала «Ученые записки Крымского федерального
университета имени В. И. Вернадского. Биология. Химия»:

Главный редактор – Чуян Елена Николаевна, д. б. н., проф.

Ответственный секретарь – Туманянц К. Н., к. б. н., доц.

Технический редактор – Ярмолук Н. С., к. б. н., доц.

Раздел «Биология»:

1. Диатроптов Михаил Евгеньевич, д. б. н., с. н. с.
2. Ивашов Анатолий Васильевич, д. б. н., проф.
3. Колесников Сергей Ильич, д. с-х. н., проф.
4. Коношенко Светлана Владимировна, д. б. н., проф.
5. Кореньков Иван Иванович, д. б. н., проф.
6. Котов Сергей Федорович, к. б. н., доц.
7. Лебедева Наталья Николаевна, д. б. н., проф.
8. Новоселов Владимир Иванович, д. б. н., проф.
9. Павленко Владимир Борисович, д. б. н., проф. (редактор раздела «Биология»)
10. Перов Сергей Юрьевич, д. б. н., в. н. с.
11. Плутатарь Юрий Владимирович, д. б. н., член-корр. РАН
12. Рубцова Нина Борисовна, д. б. н., проф.
13. Рябинина Зинаида Николаевна, д. б. н., проф.

Раздел «Химия»:

14. Гришковец Владимир Иванович, д. х. н., проф. (редактор раздела «Химия»)
15. Гусев Алексей Николаевич, д. х. н., проф.
16. Еременко Игорь Леонидович, академик РАН
17. Земляков Александр Евгеньевич, д. х. н., проф.
18. Кукушкин Вадим Юрьевич, член-корр. РАН
19. Новоторцев Владимир Михайлович, академик РАН
20. Панюшкин Виктор Терентьевич, д. х. н., проф.
21. Шульгин Виктор Федорович, д. х. н., проф.

Подписано в печать 12.12.2019. Формат 70х100 1/16.

Заказ № НП/126. Тираж 50. Индекс, цена.

Дата выхода в свет «__» _____ 2019 г.

Отпечатано в управлении редакционно-издательской деятельности
ФГАОУ ВО «КФУ имени В. И. Вернадского»

Адрес редакции, издательства и типографии:

295051, г. Симферополь, бул. Ленина, 5/7

<http://sn-biolchem.cfuv.ru>

Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского

Биология. Химия. Том 5 (71). 2019. № 4. С. 3–12.

УДК 612.846; 612.66

СКОРОСТЬ И ТОЧНОСТЬ ЗРИТЕЛЬНО ВЫЗВАННЫХ САККАД У ДЕТЕЙ 2–9 ЛЕТ

Буденкова Е. А., Ваколюк И. А.

*Институт живых систем (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Балтийский
федеральный университет имени Иммануила Канта», Калининград, Россия
E-mail: KBudenkova@gmail.com*

В исследовании рассматриваются естественные изменения пиковой скорости и точности центрифугальных зрительно вызванных саккад на возрастном промежутке от 2 до 9 лет с шагом в один год. Изучение саккад проведено на выборке из 418 (218 мальчиков) детей с помощью метода видеоокулографии. Асимметрия в пределах горизонтальных и вертикальных саккад наблюдается лишь в отдельных возрастных группах (4, 8 и 9 лет) и не несет систематического характера. Результаты исследования свидетельствуют о качественном скачке функционального созревания структур головного мозга, ответственных за регуляцию скорости и точности центрифугальных саккад, к 7 годам. Полученные данные могут послужить для создания базы глазодвигательных характеристик при нормальном развитии, и соответственно, быть полезными в области ранней диагностики нейропсихологических расстройств.

Ключевые слова: скорость саккад, точность саккад, дети, eye tracking, видеоокулография.

ВВЕДЕНИЕ

В процессе визуального восприятия важную роль играют движения глаз, прежде всего саккады. С одной стороны, от степени точности и скорости саккад зависит уровень эффективности восприятия, с другой стороны на параметры саккад влияют некоторые когнитивные процессы, такие как внимание или рабочая память. Наличие подобной взаимосвязи позволяет применять саккадические движения глаз для косвенной оценки когнитивных процессов. Работ, посвященных изучению скорости и точности саккад в норме у взрослых людей сравнительно много, относительно детей подобных работ значительно меньше [1–6]. Кроме того, характеристику точности и скорости саккад можно обнаружить в работах, связанных с изучением нейропатологий в детском возрасте [7, 8]. Большинство исследований связано с изучением горизонтальных саккад [3, 6]. Сравнение вертикальных и горизонтальных саккад в детском возрасте можно найти в составе малочисленных работ, посвященных изучению нормальной динамики параметров саккад на протяжении онтогенеза [9–12]. Исследования точности и скорости саккад проведены на разных этапах детства: 2–3 года [13], 4–13 лет [2], 6–15 лет [5, 6], 7–11 лет [1], 8–19 лет [3]. Из приведенных работ годовая характеристика саккад

проводится у [2], и [4]. Проведенные исследования не стандартизированы по методу регистрации движений глаз, стимульному материалу и объёму выборки.

Принято считать, что скорость и точность саккад растут в ходе онтогенеза (Zee, Leigh 2015), приобретая стабильные значения к 6 [3, 5] и 5–8 годам [9, 15], соответственно. Горизонтальные саккады у взрослых точнее и быстрее, чем вертикальные [14]. Это обусловлено анатомо-нейрофизиологическими различиями управляющих центров для горизонтальных и вертикальных саккад [14]. Относительно саккад в ответ на нерегулярные зрительные стимулы для взрослых в норме допускается неточность до 10 % от целевой амплитуды, для малоамплитудных саккад ($<5^\circ$) в большей степени характерна гиперметрия [14]. Сведения относительно возрастной динамики горизонтальных и вертикальных саккад неоднозначны. С одной стороны, [3, 6] сообщают, что значения скорости и точности вертикальных саккад не зависят от возраста, но [16] обнаружили обратное, а именно, увеличение по мере взросления. Согласно [4] пиковая скорость горизонтальных саккад с возрастом увеличивается, а точность снижается. Спорным моментом является наличие асимметрии саккад вверх и вниз: в работе [17] показано снижение скорости и точности (с преобладанием гипометрии) восходящих саккад с возрастом, а в работе [18] скорость восходящих саккад с возрастом повышается. С другой стороны, [16] не обнаружили возрастных изменений.

Принимая во внимание гетерохронный характер созревания головного мозга, выбор возрастного диапазона исследуемой группы становится важным критерием: для выборок широкого возрастного диапазона и/или малого объёма внутригрупповая изменчивость выше [19]. Учитывая всё вышеизложенное, цель настоящего исследования – изучить пиковую скорость и точность зрительно вызванных саккад у детей 2–9 лет с нормальным развитием. В соответствии с целью были поставлены следующие задачи: 1) исследовать пиковую скорость и точность вертикальных саккад; 2) исследовать пиковую скорость и точность горизонтальных саккад 3) сравнить вертикальные и горизонтальные саккады.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие 418 человек в возрасте от 2 до 9 лет: 236 учеников вторых классов МАОУ гимназия № 32 г. Калининград (118 мальчиков, 118 девочек), и 182 воспитанника детских садов г. Калининград (100 мальчиков, 82 девочки). Все участники исследования – здоровые дети с нормальным развитием.

Таблица 1

Половозрастная характеристика исследуемой группы

Возраст, года	2	3	4	5	6	7	8	9
Медиана $\pm$ SE	2,5 $\pm$ 0,3	3,4 $\pm$ 0,4	4,4 $\pm$ 0,2	5,4 $\pm$ 0,2	6,3 $\pm$ 0,2	7,4 $\pm$ 0,3	8,5 $\pm$ 0,1	9,5 $\pm$ 0,4
N общее (мальчики)	10(5)	30(15)	38(15)	78(37)	26(10)	48(20)	178(93)	10(5)

Перед началом исследования родители подписали информированное согласие. Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом г. Санкт-Петербург, чья деятельность согласуется с Хельсинской Декларацией, WHO Guidelines, ICH GCP и законами Российской Федерации.

Испытуемые располагались на расстоянии 60 ± 5 см от монитора ноутбука и получали инструкцию внимательно отслеживать взглядом перемещения стимульного объекта по экрану. Стимул – черный кружок ($d = 7$ мм) с белой точкой по центру – перемещается на светло-сером фоне экрана. Стимуляция зрительно вызванных саккад проводилась согласно временной схеме Step, схематичное описание которой приведено на Рисунке 1.

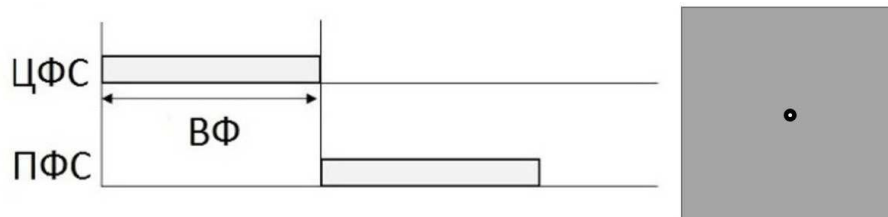


Рис. 1. Схематичное описание временной схемы (парадигмы) предъявления стимула Step (слева): ЦФС – центральный фиксационный стимул, ПФС – периферический фиксационный стимул, ВФ – время предъявления стимула (800–1300 мс); фиксационный стимул в центральном положении (справа).

В каждой парадигме центральный фиксационный стимул (ЦФС) возникал в центре экрана, после исчезновения которого появлялся периферический фиксационный стимул (ПФС) в одном из четырех положений (справа, слева, сверху, снизу). В парадигме Step каждый новый стимул возникает одновременно с исчезновением предыдущего. Стимул перемещается по схеме центр – периферия – центр в псевдослучайном порядке, продолжительность экспозиции ПФС и ЦФС варьирует в диапазоне 800–1300 мс. За одну сессию стимулировано 40 саккад амплитудой $4,5^\circ$. Регистрация проводилась в школьном помещении, соответствующем техническим и санитарным нормам, с 9 до 12 утра.

Движения глаз регистрировали с помощью айтрекера RED250mobile (SensoMotoric Instruments www.smivision.com). Данная система соответствует европейским стандартам медицинского оборудования (CE-marked, FCC EyeSafety). Частота регистрации 120 Hz, разрешающая способность $0,1$ углового градуса. RED-м обладает функцией автоматической компенсации движений головы испытуемого. Численные параметры получены с помощью программы BeGaze 3.0 (SMI, Германия). Калибровка айтрекера проводилась индивидуально. Параметры саккад оценивались для направлений вниз/вверх/вправо/влево.

Статистическая обработка полученного материала проведена с использованием SPSS 21.0. Оценка распределений на нормальность проведена с помощью непараметрического критерия Колмогорова-Смирнова ($k-s$ – стандартизированное значение критерия, при $p > 0,05$ принимается гипотеза о нормальности

распределения значений параметра). Для проверки наличия связи между количественными показателями саккад использовали коэффициент корреляции Спирмена (r – значение критерия; наличие корреляции при $p \leq 0,05$). Для внутригруппового сравнения между двумя выборками использован W -критерий Вилкоксона: W – значение критерия Вилкоксона, наличие различий при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На Рисунке 2 представлены значения пиковой скорости и точности горизонтальных (вправо/влево) и вертикальных (вниз/вверх) саккад. В Таблице 2 приведены численные значения параметра.

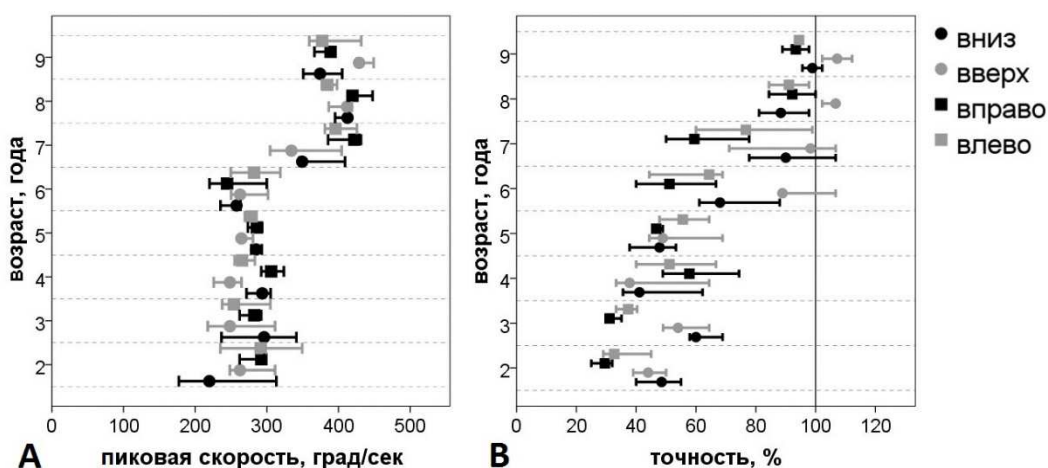


Рис. 2. Пиковая скорость (А) и точность (В) зрительно вызванных саккад, столбики ошибок обозначают 95 % доверительный интервал.

Статистически значимых различий между значениями пиковой скорости вертикальных и горизонтальных саккад не обнаружено (Рис. 2А). Пиковая скорость саккад по всем четырем направлениям сохраняет относительно стабильные значения от 2 до 6 лет, и, начиная с 7 лет, статистически значимо повышается ($r = 0,66$, $p < 0,01$; $r = 0,76$, $p < 0,01$; $r = 70$; $p < 0,01$; $r = 0,74$, $p < 0,01$). Внутригрупповое сравнение выявило асимметрию горизонтальных саккад в группах 4 и 8 лет: более высокие значения пиковой скорости саккад вправо, по сравнению с саккадами влево ($W = -4,02$, $p < 0,01$; $W = -5,10$, $p < 0,01$). Асимметрия вертикальных саккад наблюдается в группах 4 и 9 лет: в 4 годы выше скорость нисходящих саккад, в 9 лет выше скорость восходящих саккад ($W = -4,77$, $p < 0,01$; $W = -3,06$, $p = 0,002$).

На Рисунке 2В представлены значения точности горизонтальных (вправо/влево) и вертикальных (вниз/вверх) саккад. В Таблице 2 приведены численные значения параметра. Точность саккад по направлениям вниз/вверх/вправо/влево относительно плавно растет на возрастном промежутке от 2 до 7 лет ($r = 0,64$, $p < 0,01$; $r = 0,69$, $p < 0,01$; $r = 0,71$, $p < 0,01$; $r = 0,79$, $p < 0,01$), после

чего стабилизируется. Статистически значимые различия между значениями точности вертикальных и горизонтальных саккад обнаружены только для группы 3 лет ($W = -2,85$; $p=0,005$). До 6 лет вертикальные и горизонтальные саккады гипометричны, в группе 6 лет вертикальные саккады достигают нормометричных значений. В 7–9 лет как вертикальные, так и горизонтальные саккады преимущественно нормометричны. Асимметрия вертикальных саккад наблюдается в группе 8 лет: выше точность восходящих саккад ($W = -2,80$, $p = 0,005$).

Таблица 2.
Средние значения пиковой скорости и точности саккад у детей от 2 до 9 лет

Возраст, года		2	3	4	5	6	7	8	9
саккады вниз									
Скорость	медиана; CI	219; 51	296; 29	293; 13	284; 22	257; 5	349; 10	412; 11	374; 23
	k-s; p-value	0,4; 0,9	0,6; 0,8	0,7; 0,6	0,9; 0,2	1,0; 0,7	0,6; 0,7	1,1; 0,1	1,0; 0,2
Точность	медиана; CI	48; 6	60; 3	41; 9	47; 6	68; 15	90; 7	88; 6	98; 3
	k-s; p-value	0,3; 0,9	0,8; 0,4	0,9; 0,3	1,0; 0,1	0,4; 0,9	0,4; 0,9	0,6; 0,7	0,6; 0,8
саккады вверх									
Скорость	медиана; CI	262; 21	248; 23	248; 12	264; 9	262; 12	334; 19	411; 10	428; 26
	k-s; p-value	0,4; 0,9	0,7; 0,5	1,1; 0,1	0,7; 0,5	0,8; 0,5	0,7; 0,6	2; 0,01*	0,8; 0,5
Точность	медиана; CI	44; 4	54; 5	37; 7	48; 7	88; 11	98; 9	106; 5	107; 5
	k-s; p-value	0,3; 0,9	0,5; 0,8	0,9; 0,2	1,2; 0,1	0,6; 0,7	0,4; 0,9	1; 0,01	0,6; 0,8
саккады вправо									
Скорость	медиана; CI	292; 12	282; 9	305; 8	286; 9	244; 17	422; 20	419; 9	388; 24
	k-s; p-value	0,4; 0,9	0,5; 0,9	1; 0,01*	0,7; 0,7	0,3; 0,9	0,6; 0,7	1,0; 0,1	0,6; 0,7
Точность	медиана; CI	29; 2	31; 2	57; 7	46; 3	51; 15	59; 7	92; 5	93; 5
	k-s; p-value	0,4; 0,9	0,7; 0,6	0,6; 0,8	1; 0,01*	0,3; 0,9	0,6; 0,8	0,7; 0,5	0,6; 0,8
саккады влево									
Скорость	медиана; CI	291; 35	254; 17	265; 8	278; 6	282; 14	395; 15	384; 8	377; 23
	k-s; p-value	0,4; 0,9	0,5; 0,9	0,9; 0,3	0,6; 0,7	0,6; 0,7	0,7; 0,6	2; 0,01*	0,7; 0,6
Точность	медиана; CI	32; 6	37; 3	51; 7	55; 3	64; 14	76; 9	91; 4	94; 1
	k-s; p-value	0,6; 0,7	0,5; 0,9	0,6; 0,7	0,9; 0,2	0,5; 0,9	0,5; 0,8	0,4; 0,9	0,6; 0,8

Примечание: CI – доверительный интервал, k-s – стандартизированное значение критерия Колмогорова-Смирнова

Результаты исследования в общем виде вписываются в известную модель возрастной динамики параметров саккад (постепенная оптимизация значений) и не противоречит литературным данным [14]. Обнаруженное в нашей работе увеличение пиковой скорости и точности саккад к 7–9 годам также согласуется с литературными данными, однако полученные значения скорости несколько ниже известных: 200–300 град\сек против 450 град\сек для 2–3 лет, 300–450 град\сек против 530 в 7–10 лет [4]. Это может быть связано с отсутствием методической стандартизации между исследованиями. Точность саккад, по результатам данной работы, достигает уровня взрослого с 6 лет для направления вверх, с 7 лет для направления вниз и с 8 лет для горизонтальных саккад. Эти данные не противоречат результатам работ [11, 6, 20, 17] в которых сообщается, о росте гиперметрии саккад

с возрастом. В данной работе асимметрия между горизонтальными и вертикальными саккадами обнаружена только для группы 3 лет: отмечается большая точность горизонтальных саккад. Это противоречит данным [4], согласно которым для вертикальных саккад в большей степени характерна гипометрия. В отличие от работ [11, 17, 6, 16] в данном исследовании асимметрия в пределах вертикальных саккад обнаружена, но для отдельных возрастных групп. Наличие асимметрии согласуется с работами [19, 20].

Полученные результаты согласуются с известными данными об анатомо-функциональном развитии головного мозга. Элементы саккадической системы, отвечающие за скорость и точность саккад, практически полностью завершают развитие в пренатальном периоде. Однако, в постнатальном периоде продолжают развиваться нейрональная дифференциация и миелинизация этих структур [21, 22]. До двух лет активно происходит активная миелинизация в пределах ретикулярной формации [23, 24]. К 4–6 годам завершается развитие связей мозжечка (опосредующим точность движений) со стволом мозга [23, 25]. Созревание связей между мозжечком и средним мозгом происходит раньше, чем созревание связей между мозжечком и мостом [23]. А как известно, центр генерации вертикальных саккад находится в среднем мозге, а центр горизонтальных саккад в мосту [14]. Продолжительность и, соответственно, величина саккад определяется частотной активностью пачечных нейронов, находящихся в данных центрах генерации саккад и связанных с иннервацией глазодвигательных мышц. Пиковая скорость саккад также коррелирует с активностью пачечных нейронов. Тогда снижение активности пачечных нейронов может привести к гипометрии. Пачечные нейроны, связанные с выполнением саккад вверх и вниз имеют схожую импульсную активность и проекции, расположены приблизительно в равных пропорциях в центре генерации среднего мозга. Из чего правомерно предположение о том, что скорость восходящих и нисходящих саккад должна быть схожей [14].

Таким образом, гомогенность значений пиковой скорости между вертикальными и горизонтальными саккадами, а также гипометрия саккад (постепенно сменяющаяся нормометрией) может объясняться постепенным совершенствованием синаптической передачи в центрах генерации саккад на данном возрастном промежутке [14]. Несоответствие численных значений между данными нашей работы и результатами предыдущих исследований может быть обусловлено методическими различиями экспериментов, недостаточной репрезентативностью выборки. Например, с увеличением амплитуды генерируемых саккад линейно возрастает их пиковая скорость, поэтому скорость саккад должна анализироваться с учетом амплитуды [3, 6, 16].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Горизонтальные и вертикальные саккады имеют схожие скорость и точность. Характеристики вертикальных и горизонтальных саккад имеют положительную корреляцию с возрастом. Стоит отметить несколько отличающийся характер возрастных преобразований точности и скорости саккад: пиковая скорость саккад скачкообразно возрастает после 7 лет, а точность саккад возрастает равномерно.

Асимметрия скорости горизонтальных саккад наблюдается в 4 и 8 лет, вертикальных саккад в 4 и 9 лет. Асимметрия точности саккад отмечена в 8 лет только для вертикальных саккад. Зарегистрированные изменения свидетельствуют о качественном скачке в функциональном созревании ствола мозга и мозжечка, опосредующих саккады. Полученная информация относительно характеристики саккадических движений глаз при нормальном развитии, может оказаться полезной в области физиологии и психофизиологии развития, а также клинических исследований различных нейропатологий.

Список литературы

1. Accardo A. P. Some characteristics of saccadic eye movements in children of primary school age / A.P. Accardo, S. Pensiero, S. Da Pozzo, P. Perissutti // *Documenta Ophthalmologica*. – 1992. – Vol. 80(2). – P. 189–199.
2. Fukushima J. Development of voluntary control of saccadic eye movements: I. Age-related changes in normal children. / J. Fukushima, T. Hatta, K. Fukushima // *Brain and Development*. – 2000 – Vol. 22(3). – P. 173–180.
3. Salman M. S. Saccades in children / M. S. Salman, J. A. Sharpe, M. Eizenman, L. Lillakas, C. Westall, T. To, M. Dennis, M. J. Steinbach // *Vision Res.* – 2006. – Vol. 46(1). – P. 432–439.
4. Irving E. L. Horizontal saccade dynamics across the human life span / E. L. Irving, M. J. Steinbach, L. Lillakas, R. J. Babu, N. Hutchings // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2006. – Vol. 47. – P. 2478–2484.
5. Bucci M. P. Saccadic eye movements in children: a developmental study / M. P. Bucci, M. Seassau // *Experimental brain research*. – 2012. – Vol. 222(1-2). – P. 21–30.
6. Bucci M. P. Vertical saccades in children: a developmental study / M. P. Bucci, M. Seassau // *Experimental brain research*. – 2014. – Vol. 232(3). – P. 927–934.
7. Karatekin C. Eye tracking studies of normative and atypical development / C. Karatekin // *Developmental review*. – 2007. – Vol. 27(3). – P. 283–348.
8. Rommelse N. N. A review on eye movement studies in childhood and adolescent psychiatry / N. N. Rommelse, S. Van der Stigchel, J. A. Sergeant // *Brain and cognition*. – 2008. – Vol. 68(3). – P. 391–414.
9. Munoz D. P. Age-related performance of human subjects on saccadic eye movement tasks / D. P. Munoz, J. R. Broughton, J. E. Goldring, I. T. Armstrong // *Exp. Brain Res.* – 1998. – Vol. 121. – P. 391–400.
10. Smorenburg M. Using Eye Movements to Establish a Normative Database of Control Participants Across the Lifespan (Doctoral dissertation). – 2017. – P. 136.
11. Irving E. L. Difference between vertical and horizontal saccades across the human lifespan / E. L. Irving, L. Lillakas // *Experimental eye research*. – 2019. – Vol. 183. – P. 38–45.
12. Hopf S. Age dependent normative data of vertical and horizontal reflexive saccades / Hopf S., Liesenfeld M., Schmidtmann I., Ashayer S., & Pitz S. // *PloS one*. – 2018. – Vol. 13(9). – e0204008.
13. Alahyane N. Development and learning of saccadic eye movements in 7-to 42-month-old children / N. Alahyane, C. Lemoine-Lardennois, C. Tailhefer, T. Collins, J. Fagard, K. Doré-Mazars // *Journal of vision*. – 2016. – Vol. 16(1). – P. 6–6.
14. Leigh R. J. The neurology of eye movements / R. J. Leigh, D. S. Zee – Oxford: OUP, 2015. – 1109 p.
15. Fioravanti F. Saccadic eye movement conjugation in children / F. Fioravanti, P. Inchingolo, S. Pensiero, M. Spanio // *Vision research*. – 1995. – Vol. 35(23-24). – P. 3217–3228.
16. Gaertner C. Up/down anisotropies of vertical saccades in healthy children depending on the mode and the depth of execution / C. Gaertner, S. Wiener-Vacher, Z. Kapoula // *Int. J. Dev. Neurosci.* – 2016. – Vol. 52. – P. 82–92.
17. Bonnet C. Horizontal and vertical eye movement metrics: what is important? / C. Bonnet, J. Hanuška, J. Rusz, S. Rivaud-Péchoux, T. Sieger, V. Majerová, T. Serranová, B. Gaymard, E. Růžicka // *Clinical Neurophysiology*. – 2013. – Vol. 124(11). – P. 2216–2229.
18. Becker W. Human oblique saccades: quantitative analysis of the relation between horizontal and vertical components / W. Becker, R. Jürgens // *Vision research*. – 1990. – Vol. 30(6). – P. 893–920.

19. Tzelepi A. Cortical activity preceding vertical saccades: a MEG study / A. Tzelepi, N. Laskaris, A. Amditis, Z. Kapoula // *Brain Res.* – 2010. – Vol. 1321. – P. 105–116.
20. Tiadi A. Vertical saccades in dyslexic children / A. Tiadi, M. Seassau, E. Bui-Quoc, C. L. Gerard, M. P. Bucci // *Res. Dev. Disabil.* – 2014. – Vol. 35. – P. 3175–3181.
21. Barkovich A. J. Normal development of the neonatal and infant brain, skull, and spine. In A. J. Barkovich (Ed.), *Pediatric neuroimaging*, Philadelphia PA: Lippincott Williams & Wilkins. – 2000. – P. 13–69.
22. Luna B. Development of eye-movement control / B. Luna, K. Velanova, C. F. Geier // *Brain and Cognition.* – 2008. – Vol. 68(3). – P. 293–308.
23. Yakovlev P. L. The myelogenetic cycles of regional maturation of the brain. Regional development of the brain in early life / P. L. Yakovlev, A. R. Lecours – Oxford: Blackwell, 1967. – 70 p.
24. Petersen A. C. Brain maturation and cognitive development: Comparative and cross-cultural perspectives / A. C. Petersen, K. R. Gibson – NY: Routledge, 2017. – 63 p.
25. Айзман Р. И. Возрастная анатомия, физиология и гигиена: учеб. Пособие / Р. И. Айзман, Н. Ф. Лысова, Я. Л. Завьялова – М.: КноРус, 2017. – 403 с.

VELOCITY AND GAIN OF VISUALLY GUIDED SACCADDES IN CHILDREN 2–9 YEARS

Budenkova E. A., Vakoliuk I. A.

*School of life science, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia
E-mail: KBudenkova@gmail.com*

Background. An important role for visual perception play eye movements, especially saccades. Efficiency visual perception depends on the gain and velocity of saccades on the one hand, and on the other hand, cognitive processes affect saccade too. On this basis, saccades could serve for indirectly investigation cognitive function such as attention or working memory. There is a large body of literature dedicated to saccade of children with neuropathology, but saccades in normal children has been scarcely investigated. The goal of this study was to explore the peak velocity and the accuracy characteristics of centrifugal visually guided saccades in normal children.

Method and Materials. Four hundred and eighteen normal children (218 males) between two and nine years of age participated in the study.

The procedure research: children made vertical and horizontal saccades of 4.5 degrees in response to a dot stimulus in Step paradigms. Peak velocity of saccade and gain of saccade were analysed. The RED250 mobile eye-tracker was used to record saccadic eye movements. The eye-tracker had a resolution of 120 Hz, spatial resolution 0,1°. The calibration was implement automatically. Only movements of the left eye were measured. Parameters were analysed statistically using SPSS 21.0. Correlation between dependent variables and age were tested using Spearman Rank test.

Results. There was effect of age for centrifugal peak velocity and accuracy saccades. Vertical and horizontal saccades mature in parallel with age. Horizontal and vertical peak velocity are stable between the age of two and six years, and then increases. Horizontal and vertical accuracy gradually increase from two and nine years and before seven years, the majority of saccades were hypometric. There was no significant asymmetry between vertical and horizontal saccades. Up-down and right-left accuracy and peak velocity

asymmetry observed only for several groups (4, 8 and 9 years). In comparison to other studies the peak velocity of saccades in this study were very less. Reason for that could be the scarcity of methodological standardization between studies.

Conclusion. In summary, there was no significant asymmetry between vertical and horizontal saccades (for peak velocity and gain). Both horizontal and vertical saccade parameters increase with age. Perhaps because of vertical and horizontal saccades mature in parallel between two and nine years of age. Gain of saccades increased slightly between ages 2–9. And peak velocity increase abruptly from the age of 7 years. The observed results could be related to the heterochrony of development within different oculomotor areas in the brain. Results of this study may help to create saccadic control data for clinical neuropathology issue in childhood and solve age-related saccadic ambiguity.

Keywords: saccadic velocity, saccadic gain, children, eye tracking, videooculography.

References

1. Accardo A. P., Pensiero S., Da Pozzo S., Perissutti P., Some characteristics of saccadic eye movements in children of primary school age, *Documenta Ophthalmologica*, **80** (2), 189 (1992).
2. Fukushima J., Hatta T., Fukushima K., Development of voluntary control of saccadic eye movements: I. Age-related changes in normal children, *Brain and Development*, **22** (3), 173 (2000).
3. Salman M. S., Sharpe J. A., Eizenman M., Lillakas L., Westall C., To T., Dennis M., Steinbach M. J. Saccades in children, *Vision Res*, **46** (1), 432 (2006).
4. Irving E. L., Steinbach M. J., Lillakas L., Babu R. J., Hutchings N., Horizontal saccade dynamics across the human life span, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **47**, 2478 (2006).
5. Bucci M. P., Seassau M., Saccadic eye movements in children: a developmental study, *Experimental brain research*, **222** (1-2), 21 (2012).
6. Bucci M. P., Seassau M., Vertical saccades in children: a developmental study, *Experimental brain research*, **232** (3), 927 (2014).
7. Karatekin C., Eye tracking studies of normative and atypical development, *Developmental review*, **27** (3), 283 (2007).
8. Rommelse N. N., Van der Stigchel S., Sergeant J. A., A review on eye movement studies in childhood and adolescent psychiatry, *Brain and cognition*, **68** (3), 391 (2008).
9. Munoz D. P., Broughton J. R., Goldring J. E., Armstrong I. T., Age-related performance of human subjects on saccadic eye movement tasks, *Exp. Brain Res.*, **121**, 391 (1998).
10. Smorenburg M., *Using Eye Movements to Establish a Normative Database of Control Participants Across the Lifespan* [dissertation], 136 p, (Ontario, 2017)
11. Irving E. L., Lillakas L., Difference between vertical and horizontal saccades across the human lifespan, *Experimental eye research*, **183**, 38 (2019).
12. Hopf S., Liesenfeld M., Schmidtman I., Ashayer S., Pitz S., Age dependent normative data of vertical and horizontal reflexive saccades, *PloS one*, **13** (9), 1 (2018).
13. Alahyane N., Lemoine-Lardennois C., Tailhefer C., Collins T., Fagard J., Dore-Mazars K. Development and learning of saccadic eye movements in 7-to 42-month-old children, *Journal of vision*, **16** (1), 6 (2016).
14. Leigh R. J. and Zee D. S., *The neurology of eye movements*, 1109 p. (OUP, USA, 2015).
15. Fioravanti F., Inchingolo P., Pensiero S., Spanio M., Saccadic eye movement conjugation in children, *Vision research*, **35** (23-24), 3217 (1995).
16. Gaertner C., Wiener-Vacher S., Kapoula Z., Up/down anisotropies of vertical saccades in healthy children depending on the mode and the depth of execution, *Int. J. Dev. Neurosci.*, **52**, 82 (2016).
17. Bonnet C., Hanuska J., Ruzs J., Rivaud-Pechoux S., Sieger T., Majerova V., Serranova T., Gaymard B., Ruzicka E. Horizontal and vertical eye movement metrics: what is important? *Clinical Neurophysiology*, **124** (11), 2216 (2013).

18. Becker W., Jürgens R., Human oblique saccades: quantitative analysis of the relation between horizontal and vertical components, *Vision research*, **30** (6), 893 (1990).
19. Tzelepi A., Laskaris N., Amditis A., Kapoula Z., Cortical activity preceding vertical saccades: a MEG study, *Brain Res*, **1321**, 105 (2010).
20. Tiadi A., Seassau M., Bui-Quoc E., Gerard C. L., Bucci M. P., Vertical saccades in dyslexic children, *Res. Dev. Disabil.*, **35**, 3175 (2014).
21. Barkovich A. J. and Mukherjee P., Normal development of the neonatal and infant brain, skull, and spine, *Pediatric neuroimaging*, 13 (2000).
22. Luna B., Velanova K., Geier C. F., Development of eye-movement control, *Brain and Cognition*, **68** (3), 293 (2008).
23. Yakovlev P. L. and Lecours A. R., *The myelogenetic cycles of regional maturation of the brain, Resional development of the brain in early life*, 70 p. (Blackwell, Oxford, 1967).
24. Petersen A. C. and Gibson K. R., *Brain maturation and cognitive development: Comparative and cross-cultural perspectives*, 63 p. (Routledge, NY, 2017).
25. Aizman R. I., Lisova N. F., Zavialova Y. L., *Age Anatomy, Physiology and Hygiene*, 403 p. (KnoRus, M., 2017).

УДК 612.17+549.67(571.122)

ДИНАМИКА ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ ЖИТЕЛЕЙ ХМАО – ЮГРЫ В ПРОЦЕССЕ УПОТРЕБЛЕНИЯ ПРИРОДНЫХ ЦЕОЛИТОВ

Вохминцев А. П.¹, Соловьева С. В.¹, Петров И. М.¹, Зувевская Т. В.²

¹*Тюменский государственный медицинский университет Минздрава России, Тюмень,
Российская Федерация*

²*Ханты-Мансийская государственная медицинская академия, Ханты-Мансийск,
Российская Федерация
E-mail: 646224@mail.ru*

В статье проведена оценка функционального состояния сердечно-сосудистой системы жителей Ханты-Мансийского автономного округа - Югры широкого возрастного диапазона (18–75 лет) под влиянием природного цеолита (клиноптилолит) Холинского месторождения. Курсовой прием цеолитов оказал заметное влияние на состояние параметров периферической и центральной гемодинамики практически здоровых испытуемых. Практически всех обследованных группах наблюдалась тенденция к снижению частоты сердечных сокращений. Снижение диастолического артериального давления – 10–23% ($p < 0,05$) отмечалось во всех возрастных группах. Показана стабилизация приспособительных явлений и активизация антигипоксических механизмов в организме людей, проживающих на севере Тюменской области, на фоне употребления цеолитов. Отмечена перспективность оценки влияния цеолитов на лиц с патологией сердечно-сосудистой системы.

Ключевые слова: сердечно-сосудистая система, регуляция, природные цеолиты, дискомфортные территории.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее эффективных и доступных путей оздоровления населения является широкое применение природных стимуляторов функций органов и систем организма человека. В настоящее время одним из широко используемых в производстве биологически активных добавок (БАД) минералов являются природные цеолиты. Свойства последних, с неугасаемым интересом, изучаются в течение почти 20 лет [1, 2]. Сочетание ионообменных и сорбирующих свойств, а так же свойства молекулярных сит позволяет использовать цеолиты для решения проблем экологии и эндоэкологии человека [3–5].

В климатических условиях Севера Тюменской области живые организмы, в том числе человек, подвергаются действию неблагоприятных факторов окружающей среды, таких как гипоксия, холод, возмущения геомагнитного поля, производственные загрязнения и многих других. Многочисленные исследования показали, что процесс адаптации к условиям Севера дается организму очень не просто и сопровождается развитием морфофункциональных изменений сердечно-сосудистой системы, которые играют важнейшую роль в поддержании гомеостаза

организма в экстремальных условиях. Этим объясняется обширная распространенность патологий сердечно-сосудистой системы у жителей тюменского Севера [6–8].

Учитывая тесную взаимосвязь сердечно-сосудистой системы с механизмами, позволяющими не только выживать, но и сохранять здоровье в условиях Тюменского Севера, данные о разнообразных биологических свойствах цеолитов, отсутствие сведений о влиянии цеолитов на функциональные параметры сердечно-сосудистой системы людей, находящихся в природных условиях Севера, а также активную разработку цеолитовых месторождений на территории Ханты-Мансийского автономного округа – Югры (ХМАО – Югры), нам представлялось перспективным оценить функциональное состояние сердечно-сосудистой системы жителей Югры на фоне употребления природного цеолита в качестве активной добавки. Для этого, на первом этапе нами проведено исследование функционального потенциала природного цеолита у практически здоровых испытуемых широкого возрастного диапазона.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие 110 человек I группы здоровья мужского (n=47) и женского (n=63) пола, родившиеся, или проживающие на территории Ханты-Мансийского автономного округа – Югра (г. Ханты-Мансийск) более 15 лет. Все испытуемые были разделены на группы, отражающие участие человека в трудовом процессе: 18–21 год – находящиеся на пороге трудовой деятельности, студенты вузов, ССУЗов; 22–35 лет – лица, активно участвующие в трудовом процессе; 35–60 лет – опытные профессионалы, управленцы, лица, ценные в социальном отношении; 60 лет и более – пенсионеры, лица, передающие свой опыт подрастающему поколению.

В эксперименте был использован порошкообразный природный цеолит (клиноптилолит) Холинского месторождения (Якутия) производства ЗАО НПФ «Новь» (г. Новосибирск). Жители ХМАО-Югры принимали цеолиты согласно рекомендациям [9] по 1,25 г порошка 2 раза в день (утром и вечером) за 30 минут до еды, запивая 100 мл воды. Длительность приема цеолитов составила 30 дней с пятидневным перерывом в середине курса.

Для оценки состояния сердечно-сосудистой системы определяли частоту сердечных сокращений (ЧСС), систолическое (АДС) и диастолическое (АДД) артериальное давление (АД) по методу Н. С. Короткова на правой руке, с использованием тонометра и фонендоскопа в положении сидя, в покое. Пульсовое давление (ПД) вычисляли как разность АДС и АДД.

Для оценки степени напряжения регуляторных механизмов рассчитывали индексы и коэффициенты: МОК (минутный объем кровообращения, ДП (двойное произведение), ВИК (вегетативный индекс Кердо).

Статистическая обработка данных проводилась с помощью программы Microsoft Excel. Оценку вели методами вариационной статистики. Определяли среднее значение (M) и стандартную ошибку средней (m). Достоверность различий

определяли по t-критерию Стьюдента. Различия считались статистически значимыми при уровне достоверности $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Обследование здоровых мужчин и женщин, проживающих на территории ХМАО-Югры, показало наличие закономерных половых и возрастных отличий функциональных показателей периферической и центральной гемодинамики (табл. 1).

Обращают на себя внимание более низкие значения ЧСС у лиц мужского пола в сравнении с женщинами. С увеличением возраста тенденция к более редким сокращениям миокарда у мужчин становится все более заметной.

Таблица 1
Функциональные показатели и расчетные индексы органов кровообращения жителей Югры I группы здоровья в зависимости от возраста ($M \pm m$)

№	Пол	n	Возраст (годы)	ЧСС уд./мин	АДС мм.рт.ст	АДД мм.рт.ст	ПД мм.рт.ст.	МОК л/мин	ДП у.е.	ВИК у.е.
1.	м	19	18-21	73,6 $\pm$ 1,02	117,7 $\pm$ 1,51	78,2 $\pm$ 2,17	41,4 $\pm$ 1,11	4,23 $\pm$ 0,57	96,26 $\pm$ 1,79	- 7,46 $\pm$ 0,54
2.	ж	21		77,2 $\pm$ 2,60	121,5 $\pm$ 3,01	76,3 $\pm$ 0,64	45,2 $\pm$ 2,47*	5,29 $\pm$ 1,29*	94,86 $\pm$ 2,01	10,11 $\pm$ 1,76
3.	м	12	22-35	70,3 $\pm$ 1,60	122,7 $\pm$ 6,33	81,8 $\pm$ 5,90	40,9 $\pm$ 3,26	4,86 $\pm$ 0,20	85,31 $\pm$ 3,52	- 3,86 $\pm$ 4,12
4.	ж	11		73,9 $\pm$ 3,93	119,8 $\pm$ 1,64	83,5 $\pm$ 3,32	37,2 $\pm$ 2,75	4,86 $\pm$ 1,52	90,96 $\pm$ 3,03	- 16,65 $\pm$ 3,19
5.	м	12	36-60	65,7 $\pm$ 1,76	123,92 $\pm$ 7,1	83,09 $\pm$ 4,9	41,03 $\pm$ 7,1	4,69 $\pm$ 0,33	96,31 $\pm$ 4,05	-43,7 $\pm$ 4,54*
6.	ж	12		72,12 $\pm$ 3,86	125,12 $\pm$ 3,21	85,07 $\pm$ 2,68	40,4 $\pm$ 1,37	4,63 $\pm$ 0,42	90,03 $\pm$ 2,61	-19,13 $\pm$ 0,12
7.	м	17	61-75	60,0 $\pm$ 2,60*	120,9 $\pm$ 3,42	91,3 $\pm$ 1,62*	29,6 $\pm$ 0,97*	4,11 $\pm$ 1,13	89,8 $\pm$ 4,13	- 60,2 $\pm$ 7,98*
8.	ж	19		71,6 $\pm$ 3,17*	123,4 $\pm$ 2,52	86,9 $\pm$ 2,12*	36,5 $\pm$ 2,29	4,80 $\pm$ 1,40	80,7 $\pm$ 2,72*	-37,95 $\pm$ 2,45*

Примечание: * – значимые различия между показателями по возрасту.

Этот параметр явно выходит за границы нормальной возрастной периодизации для средней полосы РФ, но, в то же время, указывает на устойчивые гемодинамические характеристики. Явление брадикардии обычно свидетельствует об увеличении диастолы и повышении продуктивности сердца [10–12].

Понижение ЧСС у мужчин является адаптивным признаком и свидетельствует о развитии целесообразных механизмов работы сердца у людей, живущих на Севере продолжительный срок.

При сопоставлении этого параметра с АДС и АДД у данной категории лиц отмечена малая пульсовая разница между АДС и АДД у старших мужчин (29,6 $\pm$ 0,97 мм.рт.ст.), что является неблагоприятным адаптивным признаком. Более высокое АДД свидетельствует о напряженном состоянии сосудодвигательной регуляции и уменьшении психоэмоционального резерва мужчин пенсионного возраста [13, 14].

Показатели ВИК у практически здорового населения г. Ханты-Мансийска были близки к нормальным, с большей встречаемостью парасимпатического

преобладания, что способствует эффективному воспроизводству биохимических субстратов для реакций энергообеспечения организма [15].

Двойное произведение (ДП) у мужчин и женщин находилось в пределах функциональной нормы и демонстрировало удовлетворительную сохранность силы сокращений сердца. У пожилых женщин ДП характеризовалось более низкими значениями, но АД указывает на компенсацию силы сердечных сокращений за счет сосудистых механизмов [16].

Функциональные показатели сердечно-сосудистой системы у женщин (табл. 1) отличались большей ЧСС, чем у мужчин. Брадикардия у обследованных представительниц северной популяции не была выражена, вероятно, из-за меньшей физической нагрузки. Более высокий, чем у мужчин МОК в младшей группе отражает начальные проявления будущей гипертензии. Преобладание систолического тонуса у пожилых людей являлось общим, как для женщин, так и для мужчин. Верхняя граница АДД у «старших» женщин – $86,9 \pm 2,12$ мм.рт.ст. – не является настораживающим фактором, т.к. находилась в рамках возрастной нормы. Таким образом, полученные нами в ходе обследования данные о состоянии функциональных показателей периферической и центральной гемодинамики женщин, проживающих на севере Тюменской области, находятся вблизи верхней границы физиологической возрастной нормы.

Следующим этапом работы стало исследование функциональных показателей сердечно-сосудистой системы практически здоровых мужчин и женщин разных возрастных категорий, проживающих на территории ХМАО-Югры на фоне применения минеральной добавки к пище на основе натуральных цеолитов.

Результаты измерений функциональных показателей и расчетные индексы практически здоровых женщин и мужчин, принявших участие в эксперименте, приведены в Таблице 2.

Незначительное снижение ЧСС наблюдалось у представителей первой и второй возрастных групп обоих полов. Наиболее существенные различия отмечены в самой старшей возрастной группе. Так, у старших мужчин этот показатель был достоверно выше на $2,1$ уд./мин ($p < 0,05$), а у старших женщин снизился на 8% ($5,4$ уд./мин $p < 0,05$).

Отрицательный хронотропный эффект сопровождается очевидным снижением АДС. Так, у женщин первой возрастной группы этот показатель был в среднем на 7 мм.рт.ст. ($p < 0,05$) ниже, в сравнении с аналогичными значениями до начала эксперимента. Учитывая достаточно большую стандартную ошибку средней, незначительное снижение АДС показанное у женщин третьей и четвертой возрастных групп находилось в пределах статистической погрешности. У мужчин наблюдался незначительный прирост АДС в первой возрастной группе (в среднем на $1,5$ мм.рт.ст., $p < 0,05$) и снижение в остальных. Диастолическое давление было снижено во всех группах обследованных женщин и мужчин. Различия показателей АДД до и после употребления цеолитов являются наиболее достоверно значимыми и характеризуют общепопуляционную стратегию, выраженную в снижении напряжения сосудодвигательной регуляции. Большие значения стандартной ошибки

средней арифметической показывают разнообразные индивидуальные стратегии адаптации обследованных групп лиц в ответ на употребление минеральной добавки.

Таблица 2
Функциональные показатели и расчетные индексы органов кровообращения жителей Югры I группы здоровья после употребления цеолитов ($M \pm m$)

№	Пол	n	Возраст (годы)	ЧСС уд./мин	АДС мм. рт. ст	АДД мм. рт. ст	ПД мм.рт.ст.	МОК л/мин	ДП у.е.	ВИК у.е.
1.	м	19	18-21	71,3 $\pm$ 2,23 [#]	119,2 $\pm$ 2,53 [#]	69,3 $\pm$ 2,17 [#]	49,9 $\pm$ 2,29 [#]	5,12 $\pm$ 1,97	84,99 $\pm$ 2,35 [#]	2,80 $\pm$ 2,16 [#]
2.	ж	21		76,4 $\pm$ 4,90 [#]	114,5 $\pm$ 4,44 ^{**}	65,3 $\pm$ 3,12 [#]	49,2 $\pm$ 3,95 [#]	5,62 $\pm$ 0,71	87,48 $\pm$ 3,96 [#]	14,53 $\pm$ 3,62 [#]
3.	м	12	22-35	69,8 $\pm$ 2,12	119,6 $\pm$ 6,67	76,1 $\pm$ 3,87 [#]	41,8 $\pm$ 3,88 [#]	4,92 $\pm$ 1,54	83,16 $\pm$ 3,47	-9,39 $\pm$ 3,56 [#]
4.	ж	11		73,8 $\pm$ 4,65	116,9 $\pm$ 7,12	74,2 $\pm$ 2,53 [#]	42,6 $\pm$ 6,31 [#]	5,03 $\pm$ 1,38	85,71 $\pm$ 4,65 [#]	-0,52 $\pm$ 5,03 ^{**}
5.	м	12	36-60	66,1 $\pm$ 2,33	120,4 $\pm$ 3,12	81,26 $\pm$ 2,83	40,66 $\pm$ 4,82	4,71 $\pm$ 1,07	80,50 $\pm$ 3,33 [#]	22,98 $\pm$ 2,03 ^{**}
6.	ж	12		69,3 $\pm$ 4,11	124,6 $\pm$ 2,42	79,22 $\pm$ 3,46	43,96 $\pm$ 2,08	4,83 $\pm$ 0,96	89,23 $\pm$ 5,06	-15,26 $\pm$ 3,33 [#]
7.	м	17	61-75	62,1 $\pm$ 1,98 [*]	122,3 $\pm$ 2,15	83,2 $\pm$ 2,23 ^{**}	39,1 $\pm$ 2,18 [#]	4,32 $\pm$ 1,39	75,95 $\pm$ 2,03 ^{**}	33,98 $\pm$ 2,03 ^{**}
8.	ж	19		66,2 $\pm$ 3,21 [#]	122,6 $\pm$ 4,28	76,3 $\pm$ 3,71 [#]	46,3 $\pm$ 4,03 ^{**}	4,96 $\pm$ 0,83	81,16 $\pm$ 3,65	-15,26 $\pm$ 3,33 [#]

Примечание: * - значимые различия между показателями по возрасту
Достоверность [#] – $p < 0,05$ изменения достоверны относительно начала исследования

Как показали наши модельные эксперименты на крысах [17], употребление в пищу порошкообразных цеолитов ведет к улучшению деформабильности эритроцитов, что, в свою очередь, снижает сопротивление сосудистой стенки в процессе микроциркуляции и опосредованно может служить причиной снижения АДД.

Расчетные индексы, определенные на основании гемодинамических показателей, также свидетельствовали о включении новых механизмов в организме человека на фоне приема цеолитов. Рост пульсового давления практически во всех обследованных группах по сравнению с началом эксперимента ($p < 0,05$) обусловлен снижением диастолического артериального давления. Более быстрое изгнание крови из сердца, вызванное повышением сократительной способности миокарда, может в некоторой степени увеличить пульсовое давление [11].

Повышение ПД практически до верхней границы нормы (50 мм.рт.ст.) в младших возрастных группах не является позитивным адаптивным признаком и требует дальнейшего изучения в ходе наших будущих исследований.

Величины двойного произведения были достоверно ($p < 0,05$) ниже как у обследованных мужчин, так и у женщин. В данном случае можно косвенно говорить о снижении уровня нагрузки на сердечную мышцу и уменьшении потребности миокарда в кислороде.

Значения ВИК обследуемых закономерно отличались от исходных данных. В некоторых случаях индекс показал замену парасимпатикотонии на симпатикотонию и нормотонию.

Таким образом, оценивая только основные функциональные показатели сердечно-сосудистой системы и расчетные индексы, можно сделать вывод о

заметном влиянии цеолитов. На фоне снижения ЧСС и АД у жителей Севера Тюменской области наблюдалось улучшение самочувствия и работоспособности. Расчетные индексы показывали стабилизацию приспособительных явлений и активизацию антигипоксических механизмов.

Данный этап эксперимента представляется стартовым для дальнейших исследований на людях с функциональными нарушениями гемодинамики, в ходе которого мы попытались выявить общие закономерности и определенные негативные эффекты влияния порошкообразного цеолита на организм человека, проживающего в климато-экологических условиях тюменского Севера.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Функциональные показатели сердечно-сосудистой системы и расчетные индексы органов кровообращения у здоровых лиц, проживающих на территории ХМАО-Югры в большинстве соответствуют возрастным на верхней, или нижней границе нормы.
2. Употребление порошкообразного природного цеолита в качестве БАД оказывает заметное влияние на состояние параметров периферической и центральной гемодинамики практически здоровых испытуемых широкого возрастного диапазона.
3. В общебиологическом контексте, влияние природных цеолитов на все группы испытуемых лиц можно охарактеризовать как положительное. БАД способствовала оптимизации функциональных показателей и расчетных индексов органов кровообращения.
4. К факторам риска можно отнести пограничные значения индекса «пульсовое давление» у мужчин и женщин 18–21 года. Данный параметр требует особого внимания в ходе дальнейших исследований.

Список литературы

1. Bacakova L. Applications of zeolites in biotechnology and medicine – a review. / Bacakova L., Vandrovcova M., Kopova I., Jirka I. // *Biomaterials Science*. – 2018. – May 1; 6(5). – P. 974–989.
2. Laurino C. Zeolite: "The magic stone"; Main nutritional, environmental, experimental and clinical fields of application. / Laurino C., Palmieri B. // *Nutrition Hospitalaria*. – 2015. – Aug 1;32(2):5. – P. 73–81.
3. Atitlán-Gil A. Activated and micronized zeolite in the modulation of cellular oxidative stress in Mexican smokers: a randomized clinical trial. / Atitlán-Gil A., Bretón-de la Loza M. M., Jiménez-Ortega J. C., Belefant-Miller H., Betanzos-Cabrera G. // *Rev. Invest. Clin.* – 2017. – 69. – P. 146.
4. Cutovic M. Clinoptilolite for treatment of dyslipidemia: preliminary efficacy study / Cutovic M., Lazovic M., Vukovic-Dejanovic V., Nikolic D., Petronic-Markovic I., Cirovic D. // *J. Altern. Complement. Med.* – 2017. – 23. – P. 738.
5. Ivkovic S. Dietary supplementation with the tribomechanically activated zeoliteclinoptilolite in immunodeficiency: effects on the immune system / Ivkovic S., Deutsch U., Silberbach A., Walraph E., Mannel M. // *Adv Ther.* – 2004. – 21(2). – P. 135–147.
6. Авцын А. П. Патология человека на Севере / А. П. Авцын, А. А. Жаворонков, А. Г. Марачев, А. П. Милованов. – М.: Медицина, 1985. – 415 с.
7. Акклиматизация военнослужащих в районах Крайнего Севера и Арктики средствами физической подготовки / М. Н. Савин, Б. А. Иванов, И. В. Корчагин, М. А. Окишев // *Ученые записки университета им. П. Ф. Лесгафта*. – 2018. – №2 (156). – С. 207.

8. Проблемы адаптации к гипотермальным воздействиям в условиях Севера РФ / А. Е. Баженова, А. А. Пахомов, Е. В. Валиева, Я. Ю. Алексеев // Сложность. Разум. Постнеклассика. – 2016 – №4 – С. 47–52.
9. Методические рекомендации в области оздоровительного (функционального) питания при различных состояниях [Текст]. – Новосибирск: СФЦОП, 2007. – 89 с.
10. Нифонтова О. Л. Оценка показателей гемодинамики школьников севера РФ / О. Л. Нифонтова, Ю. В. Карбаинова, К. С. Конькова, Я. И. Ураева // Сложность. Разум. Постнеклассика. – 2017 – №4 – С. 36–42.
11. Соловьева С. В. Физиология и патология кровообращения и дыхания у человека на Севере / С. В. Соловьева, А. В. Елифанов, С. В. Качин, В. С. Соловьев. – Тюмень: изд-во ТюмГУ, 2008. – 114 с.
12. Филатова Д. Ю. Сравнительный анализ хаотической динамики параметров кардио-респираторной системы детско-юношеского населения Югры / Д. Ю. Филатова, К. А. Эльман, М. А. Срыбник, О. А. Глазова // Сложность. Разум. Постнеклассика. – 2017 – №1 – С. 12–18.
13. Говорухина А. А. Состояние сосудов как один из критериев адаптации организма в условиях Севера / А. А. Говорухина, О. А. Мальков, А. А. Новоселова // Электронный научно-образовательный Вестник «Здоровье и образование в XXI веке» – 2016 – № 18 (11). – С. 55–58.
14. Хаснулин В. И. Психозомоциональный стресс и метеореакция как системные проявления дизадаптации человека в условиях изменения климата на Севере России / В. И. Хаснулин, А. В. Хаснулина // Экология человека. – 2012. – № 8. – С. 3–7.
15. Основы физиологии человека / Под ред. Акад. Б. И. Ткаченко. Т.3 Клинико-физиологические аспекты. – М.: «Литера». – 1998. – 473 с.
16. Депутат И. С. Влияние климатозоологических условий Севера на процессы старения / И. С. Депутат, И. Н. Дерябина, А. Н. Нехорошкова, А. В. Грибанов // Журнал медико-биологических исследований. – 2017. – Т. 5, № 3. – С. 5–17.
17. Вохминцев А. П. Влияние цеолитов на показатели деформируемости эритроцитов беспородных крыс / А. П. Вохминцев, В. С. Соловьев // Вестник ТюмГУ. – 2008. – №3. – С. 28–34.

DYNAMICS OF FUNCTIONAL CONDITION OF THE CARDIOVASCULAR SYSTEM OF RESIDENTS OF THE KHAMAO - UGRA IN THE PROCESS OF USE OF NATURAL ZEOLITES

Vokhmintsev A. P.¹, Solov'eva S. V.¹, Petrov I. M.¹, Zuevskaya T. V.²

¹*Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation*

²*Khanty-Mansiysk State Medical Academy, Khanty-Mansiysk, Russian Federation*

E-mail: 646224@mail.ru

Objective: Assessment of the cardiovascular system's functional state of residents of the Khanty-Mansiysk Autonomous Okrug – Ugra of a wide age range under the influence of natural zeolite (clinoptilolite) of the Kholinsky deposit. **Materials and methods.** Test subjects are men and women who belong to the first health group, aged 18–75, both living in the territory of KhMAO-Yugra. The subjects were divided into four age groups, reflecting their participation in the labor process. All of the studied participants were administered the powdered natural zeolite from the Kholinsky deposit for a 30-day period with a five-day break in the middle of the course. The functional state of the cardiovascular system was assessed by means of the standard methods of measuring blood pressure and heart rate. The degree of tension of regulatory mechanisms was determined

by calculating indices and coefficients. **Results.** The intake of zeolites produced a noticeable effect on the state of the peripheral and central hemodynamic parameters of practically healthy subjects. Almost all the examined groups indicated the trend, featuring the lower heart rate. A decrease of diastolic blood pressure by 10–23 % ($p < 0.05$) was observed in all age groups. Differences of diastolic blood pressure indicators before and after the use of zeolites are most reliably significant and characterize the general population strategy, expressed in reducing the tension of vasomotor regulation. Large values of the standard error of the arithmetic mean show a variety of individual strategies for adapting the examined groups of individuals in response to the use of a mineral supplement. A decrease of the diastolic blood pressure led to an increase of the pulse pressure index, which may be associated with faster expulsion of blood from the heart, caused by an increase in myocardial contractility. An increase of the pulse pressure almost to the upper limit of the norm (50 mmHg) in younger age groups is not a positive adaptive sign and requires further study in the course of our future studies. The values of the double product were significantly ($p < 0.05$) lower both in the examined men and in women. In this case, we can indirectly talk about reducing the level of load on the heart muscle and reducing the oxygen demand of the myocardium. The values of the Cerdo Vegetative Index of the subjects were naturally different from the initial data. In some cases, the index showed the replacement of parasympathicotonia with sympathicotonia and normotonia.

Thus, evaluating only the main functional indicators of the cardiovascular system and calculated indices, we can conclude that the zeolites are noticeable. Against the background of a decrease in heartbeats and diastolic blood pressure, residents of the North of the Tyumen Region experienced an improvement in well-being and performance. The calculated indices showed stabilization of adaptive phenomena and activation of antihypoxic mechanisms. This stage of the experiment seems to be the starting point for further studies in people with functional hemodynamic impairments, during which we tried to identify general patterns and certain negative effects of the effect of powdered zeolite on the human body living in the climatic and environmental conditions of the Tyumen North. **Conclusion.** The studies show the perspective assessment of the effect of zeolites on people with the cardiovascular system pathologies.

Keywords: cardiovascular system, regulation, natural zeolites, uncomfortable territories.

References

1. Bacakova L., Vandrovcova M., Kopova I., Jirka I. Applications of zeolites in biotechnology and medicine – a review, *Biomaterials Science*, **6(5)**, 974 (2018).
2. Laurino C., Palmieri B. Zeolite: "The magic stone"; Main nutritional, environmental, experimental and clinical fields of application, *Nutrition Hospitalaria*, **32(2):5**, 73 (2015).
3. Atitlán-Gil A., Bretón-de la Loza M. M., Jiménez-Ortega J. C., Belefant-Miller H., Betanzos-Cabrera G. Activated and micronized zeolite in the modulation of cellular oxidative stress in Mexican smokers: a randomized clinical trial, *Rev. Invest. Clin.*, **69**, 146 (2017).
4. Cutovic M., Lazovic M., Vukovic-Dejanovic V., Nikolic D., Petronic-Markovic I., Cirovic D. Clinoptilolite for treatment of dyslipidemia: preliminary efficacy study, *J. Altern. Complement. Med.*, **23**, 738 (2017).

5. Ivkovic S., Deutsch U., Silberbach A., Walraph E., Mannel M. Dietary supplementation with the tribomechanically activated zeoliteclinoptilolite in immunodeficiency: effects on the immune system, *Adv Ther*, **21**(2), 135 (2004).
6. Avzin A. P., Javoronkov A. A., Marachev A. G., Milovanov A. P. *Patologiya cheloveka na Severe* [Pathology of humans in the North], 415 p. (Moscow, Medicina Publ., 1985).
7. Savin M. N., Ivanov B. A., Korchagin I. V., Okishev M. A. Acclimatization of military personnel in the regions of the far north and the Arctic by means of physical, *Scientific notes of the University P. F. Lesgaft*, **2** (156), 207 (2018) (in Russ.)
8. Bazhenova A. E., Pahomov A. A., Valieva E. V., Alekseenko Ia. U. Problems of adaptation to hypothermal stress in the north of the Russian Federation, *Complexity. Mind. Post-non-classics*, **4**, 47 (2016) (in Russ.)
9. *Methodical recommendations in the field of health (functional) nutrition in various conditions*. Novosibirsk, 89 p. (Publ. of Siberian Federal Center of Health Nutrition, 2007).
10. Nifontova O. L., Karbainova YU. V., Konkova K. S., Uraeva YA. I. Estimations of the indicators of the hemodynamics of schoolboys of the north of the Russian Federation, *Complexity. Mind. Post-non-classics*, **4**, 36 (2017) (in Russ.)
11. Solov'eva S. V., Elifanov A. V., Kachin S. V., Solov'ev V. S. *Fiziologiya i patologiya krovoobrashcheniya i dyhaniya u cheloveka na Severe* [Physiology and pathology of circulation and respiration in humans in the North], 114 p. (Tyumen, Pub. of TyuSU, 2008).
12. Filatova D. YU., Elman K. A., Srybnik M. A., Glazova O. A. Comparative analysis of the chaotic dynamics of cardio-respiratory parameters of the children's population of UGRA, *Complexity. Mind. Post-non-classics*, **1**, 12 (2017) (in Russ.)
13. Govoruhina A. A., Mal'kov O. A., Novoselova A. A. Vascular conditions as one of the criteria of adaptation in the north. *Elektronnyj nauchno-obrazovatel'nyj vestnik «Zdorov'e i obrazovanie v XXI veke»* [Online scientific educational Bulletin "Health and Education Millennium"], **18**, **11**, 55 (2016) (in Russ.).
14. Hasnulin V. I., Hasnulina A. V. [Psycho-emotional stress and meteororeacton as systemic manifestation of human disadaptation under changing climatic conditions in the north of Russia]. *Ekologiya cheloveka* [Human Ecology], **8**, 3 (2012) (in Russ.)
15. Tkachenko B. I. *Osnovy fiziologii cheloveka T.3. Kliniko-fiziologicheskie aspekty* [Human physiology bases. T. 3 Kliniko-physiological aspects]. Moscow, Publ. «Litera», 473 p. (1998).
16. Deputat I. S., Deryabina I. N., Nekhoroshkova A. N., Griбанov A. V. Effect of Climatic and Ecological Conditions of the North on Ageing Processes. *Journal of Medical and Biological Research*, **5**, **3**, 5 (2017).
17. Vokhmintsev A. P., Solov'ev V. S. [The influence of zeolites to the deformability of erythrocytes of outbred rats], *Vestnik Tyumenskogo Gosudarstvennogo Universiteta* [Bulletin of the Tyumen State University], **3**, 28 (2008) (in Russ.)

УДК 581.524.1/582.661(477.75)

**ХАРАКТЕРИСТИКА АЛЛЕЛОПАТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
ВОДОРАСТВОРИМЫХ ВЕЩЕСТВ *HALIMIONE VERRUCIFERA* (M.BIEB.)
AELLEN ПРИ ТЕРМИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ**

Ганусяк А. П., Симагина Н. О., Пищурова В. С.

*Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», Симферополь, Республика Крым, Россия
E-mail: golden-1392@mail.ru*

Представлены результаты изучения влияния аллелопатически-активных веществ *Halimione verrucifera* (M. Bieb.) Aellen на *Suaeda prostrata* Pall. и *Salicornia europaea* L. (тест-объекты). Установлено, что в лабораторных условиях *H. verrucifera* оказывает ингибирующее воздействие. Показана лабораторная всхожесть семян, а также влияние веществ водных экстрактов различных концентраций из надземных и подземных частей *H. verrucifera* при термическом воздействии.

Ключевые слова: прорастание семян, ингибирование, экстракт, тест-объект, аллелопатия, *Halimione verrucifera* (M. Bieb.) Aellen, *Suaeda prostrata* Pall., *Salicornia europaea* L.

ВВЕДЕНИЕ

Аллелопатия – это взаимодействие растений посредством выделения биологически активных веществ во внешнюю среду [1]. Аллелопатическая активность растений обусловлена совокупностью веществ различной природы, а не одним определенным специфическим для данного вида соединением [2]. Выделяемые растениями вещества аллелопатической природы при растворении в почвенном покрове или воздухе, могут распространяться на значительные расстояния и оказывать существенное влияние не только на соседние, но и на сравнительно далеко обитающие организмы. Вокруг каждого растения в пределах фитогенного поля формируется «аллелопатическая сфера», существующая за счет накопления в среде метаболитов, обладающих аллелопатической активностью [3–5].

Несмотря на интенсивное изучение в последнее время аллелопатии, полученные результаты являются ограниченными или дискуссионными [6]. Некоторые авторы относятся к информации о проявлении аллелопатических эффектов скептически, т.к. исследования проводятся главным образом в лабораторных условиях, не аналогичных природным [7, 8]. Изучение аллелопатии преимущественно в лабораторных, контролируемых условиях, обусловлено тем, что в природных биоценозах на этот процесс одновременно влияют многие биотические и абиотические факторы, что затрудняет интерпретацию полученных результатов [9].

В настоящее время мало изучен аллелопатический аспект взаимодействия растений в условиях засоленности почв. Важным теоретическим и практическим

значением является выявление роли аллелопатии в развитии и формировании галофитных сообществ.

В связи с прекращением функционирования Северо-крымского канала образовалась так называемая «застойная зона». Из чего следует актуальность изучения данного вопроса.

Цель настоящей работы состояла в выявлении аллелопатических взаимодействий в галофитных сообществах Республики Крым посредством определения сохранения аллелопатической активности, при трансформации веществ с использованием растительного материала прошедшего термическую обработку. В задачи исследования входило определение всхожести семян и длины проростков *Salicornia europaea* L. и *Suaeda prostrata* Pall., при влиянии водорастворимых веществ *Halimione verrucifera* (M. Bieb.) Aellen. для различных концентраций и установление аллелопатической активности водорастворимых выделений *Halimione verrucifera* (M. Bieb.) Aellen.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили в Северо-Западном Крыму в течение вегетационного периода 2017, 2018 гг. на берегу озера Джарылгач (с. Межводное, Черноморский район). В стадии генеративной зрелости были собраны особи *H. verrucifera*, *S. prostrata* и *S. europaea*.

H. verrucifera (семейство *Chenopodiaceae* Vent.) – многолетнее растение, полукустарничек высотой 20–50 см, гликогалофит, произрастающий на солончаках. [10].

S. europaea (семейство *Chenopodiaceae* Vent.) – однолетнее растение, относящееся к группе эугалофитов, с сочным ветвистым стеблем и редуцированными листьями, по форме напоминающими чешуйки, высотой до 30 см [11].

S. prostrata (семейство *Chenopodiaceae* Vent.) – однолетнее зеленое или желтовато-зеленое, в конце онтогенеза краснеющее иногда у основания деревесенеющее, от самого основания ветвистое, часто с приподнимающимися ветвями высотой 10–75 см [12]. Относится к группе эугалофитов.

Для определения аллелопатических свойств *H. verrucifera* была проведена серия биотестов, в которых определялась аллелопатическая активность листьев, корней, стеблей и соцветий после термического воздействия. Растения *H. verrucifera* помещались в термосушильный шкаф на 35 дней при температуре 25 °С. Приготовление экстрактов физиологически активных веществ проводили по методике А. М. Гродзинского [13]. Аллелопатическое влияние *H. verrucifera* оценивалось по воздействию водных экстрактов различных концентраций 1 %, 5 %, 10 % на всхожесть семян и рост проростков тест-объектов *S. prostrata* и *S. europaea*.

Семена последнего года репродукции *S. prostrata*, и *S. europaea* проращивались в чашках Петри на ложе из фильтровальной бумаги, при температуре 23 °С в количестве 10 штук при увлажнении водными экстрактами *H. verrucifera* при пяти вариантах условий: увлажнение водным экстрактом из листьев; увлажнение водным экстрактом из корней; увлажнение водным экстрактом из стеблей; увлажнение водным экстрактом из соцветий; увлажнение дистиллированной водой (контроль).

Определение всхожести семян и измерение длины проростков проводили в течение 10 суток по общепринятым методикам. Повторность опытов трехкратная. Полученные результаты обрабатывались стандартными методами математической статистики [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно литературным данным известно, что вещества претерпевают изменения при температурной обработке [15]. В ходе исследования влияния водных экстрактов частей надземных и подземных органов *H. verrucifera* различных концентраций на прорастание семян и рост проростков отмечена различная аллелопатическая толерантность у тест-объектов *S. prostrata* и *S. europaea*. Определив всхожесть семян тест-объектов *S. prostrata* и *S. europaea* в контрольных и опытных вариантах, возможно заключить, что экстракты из различных органов *H. verrucifera* оказывают как ингибирующее, так и стимулирующее действие на определенных этапах прорастания семян и роста проростков *S. prostrata* и *S. europaea* (табл. 1, рис. 1) после термической трансформации.

В ходе эксперимента установлено, что при увлажнении 1 % водным экстрактом из листьев *H. verrucifera* стимулировалась как всхожесть семян *S. prostrata*, так и рост проростков тест-объекта. С увеличением концентрации до 5 % происходило ингибирование прорастания семян тест-объекта, показатели длины проростков *S. prostrata* при этом составили $2,6 \pm 0,3$ (см), что на 46 % ниже, чем в контроле. Под воздействием высоких концентраций 10 % водного экстракта из листьев у семян тест-объекта *S. prostrata* установлено отсутствие всхожести, что свидетельствует о сильном ингибирующем эффекте аллелопатически активных веществ после термической обработки *H. verrucifera* (табл. 1).

Водные экстракты из корней *H. verrucifera* оказывают незначительное ингибирующее действие на всхожесть семян тест-объекта *S. prostrata*. Всхожесть семян *S. prostrata* в контроле составила 90 %, тогда как при увлажнении водным экстрактом *H. verrucifera* концентрации 1 %, 5 % и 10 % наблюдались одинаковые показатели прорастания семян – 86 % (рис. 1). Наиболее ингибирующее действие на рост проростков тест-объекта оказывают активные вещества водного экстракта *H. verrucifera* 10 % концентрации, при этом длина проростков *S. prostrata* составляла $2,4 \pm 0,1$ (см), что на 55 % меньше чем в контроле.

Водные экстракты из корней *H. verrucifera* оказывают незначительное ингибирующее действие на всхожесть семян тест-объекта *S. prostrata*. Всхожесть семян *S. prostrata* в контроле составила 90 %, тогда как при увлажнении водным экстрактом *H. verrucifera* концентрации 1 %, 5 % и 10 % наблюдались одинаковые показатели прорастания семян – 86 % (рис. 1). Наиболее ингибирующее действие на рост проростков тест-объекта оказывают активные вещества водного экстракта *H. verrucifera* 10 % концентрации, при этом длина проростков *S. prostrata* составляет $2,4 \pm 0,1$ (см), что на 55 % меньше чем в контроле.

Таблица 1

Динамика роста проростков *Suaeda prostrata* Pall. при увлажнении водными экстрактами *Halimione verrucifera* (M.Bieb.) Aellen разных концентраций

День экспери- мента	Длина проростков <i>Suaeda prostrata</i> Pall., см			
		Концентрация экстракта		
	контроль	1%	5%	10%
		Экстракт из листьев		
3	3,20±0,40	2,90±0,30	1,00±0,20	-
6	4,40±0,25	4,60±0,20	2,40±0,30	-
8	4,70±0,30	4,80±0,30	2,50±0,30	-
10	5,00±0,30	5,00±0,30	2,60±0,30	-
		Экстракт из корней		
3	3,20±0,40	1,20±0,10	0,60±0,10	0,60±0,10
6	4,40±0,25	3,90±0,20	1,40±0,10	1,50±0,10
8	4,70±0,30	4,00±0,20	2,20±0,10	2,10±0,10
10	5,00±0,30	4,40±0,20	2,60±0,10	2,40±0,10
		Экстракт из стеблей		
3	3,20±0,40	2,60±0,30	1,80±0,20	0,80±0,10
6	4,40±0,25	5,00±0,20	4,10±0,30	2,70±0,20
8	4,70±0,30	5,10±0,20	4,50±0,30	3,50±0,20
10	5,00±0,30	5,30±0,20	4,40±0,30	3,60±0,20
		Экстракт из соцветий		
3	3,20±0,40	2,20±0,20	1,40±0,20	0,60±0,10
6	4,40±0,25	2,90±0,10	2,00±0,10	0,70±0,10
8	4,70±0,30	3,00±0,10	2,50±0,10	1,00±0,10
10	5,00±0,30	3,90±0,20	3,30±0,10	1,40±0,10

Полученные данные воздействия аллелопатически активных водорастворимых веществ 1 % концентрации из стеблей *H. verrucifera*, свидетельствует о стимулирующем воздействии на рост проростков тест-объекта. Показатели длины

проростков *S. prostrata* в течение эксперимента при увлажнении 1 % водным экстрактом из стеблей *H. verrucifera* были на 1,8 % выше, чем в контроле. Итоговые показатели длины проростков *S. prostrata* на 10 день эксперимента составили $5,3 \pm 0,2$ (см), а в контроле $5,2 \pm 0,1$ (см) (табл. 1). Анализируя всхожесть семян при увлажнении водным экстрактом *H. verrucifera* из стеблей установлено снижение показателей всхожести семян *S. prostrata* при увлажнении экстрактом 1 % концентрации на 11 %, при 5 % концентрации на 15 %, при 10 % концентрации на 18 % по сравнению с контролем соответственно (рис. 1).

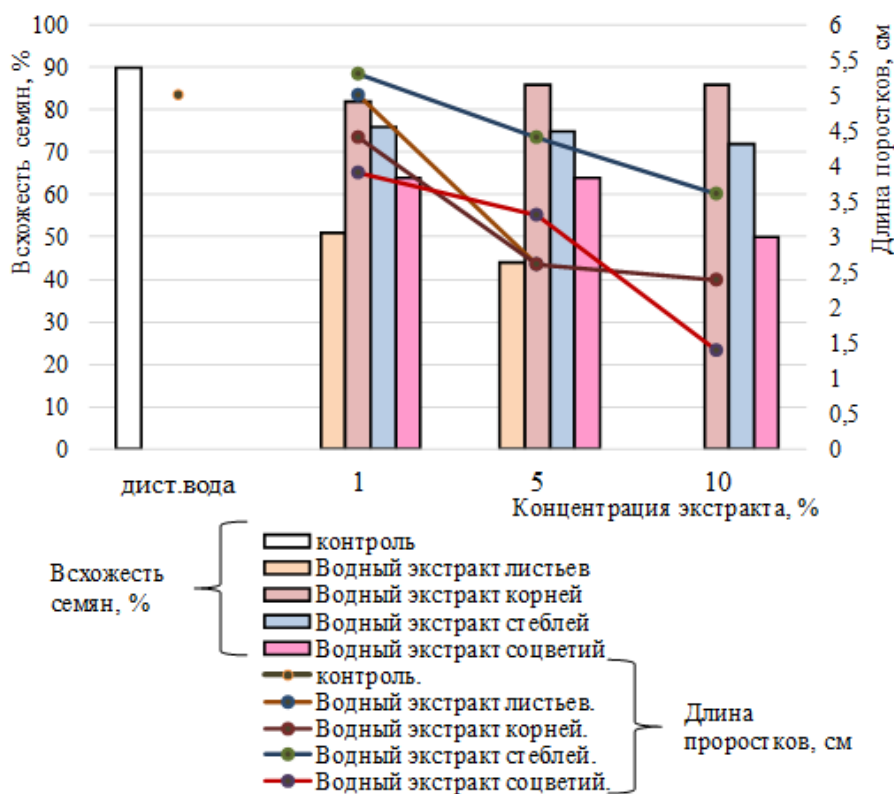


Рис. 1. Влияние аллелопатически активных веществ *Halimione verrucifera* (M. Bieb.) Aellen разных концентраций на всхожесть семян и рост проростков *Suaeda prostrata* Pall. при термической обработке растений.

При воздействии водных экстрактов из соцветий *H. verrucifera* на прорастание семян тест-объекта наблюдалась аналогичная тенденция увеличения показателей длины проростков *S. prostrata* при снижении концентрации аллелопатически активных веществ *H. verrucifera* от $1,4 \pm 0,1$ (см) (10 % концентрация) до $3,9 \pm 0,2$ (см) (1 % концентрация) (табл. 1). В данной серии биотестов при увлажнении водными

экстрактами *H. verrucifera* минимальная всхожесть семян *S. prostrata* составила 50 % (10 % концентрации), максимальная 70 % – при увлажнении водным экстрактом 1 % концентрации, что на 20 % меньше чем в контроле (рис. 1).

В ходе анализа данных было установлено, что при увлажнении водными экстрактами из листьев *H. verrucifera* оказывало наибольшее ингибирующее влияние как на всхожесть семян *S. europaee*, так и на рост проростков при любой концентрации (табл. 2, рис. 2). С увеличением концентрации до 10 % происходило угнетение прорастания семян тест-объекта на 50 %, показатели длины проростков *S. europaee* при этом составили $0,2 \pm 0,05$ (см), что на 93 % ниже чем в контроле.

Полученные данные воздействия аллелопатически активных водорастворимых веществ 1 % концентрации из корней *H. verrucifera*, свидетельствуют о стимулирующем эффекте на рост проростков. В конце эксперимента показатели длины проростков *S. europaee* составили $0,9 \pm 0,1$ (см), а в контроле $0,82 \pm 0,1$ (см). При воздействии большими концентрациями, наблюдалось угнетение роста проростков (табл. 2). Всхожесть семян тест-объекта в контроле составила 63 %, при увлажнении водным экстрактом корней *H. verrucifera* концентрации 1 %, 5 %, 10 % наблюдались одинаковые показатели прорастания семян – 40 % (рис.2).

Водорастворимые вещества из стеблей *H. verrucifera* оказывают ингибирующее действие на тест-объект. Наибольшее угнетающее действие на рост проростков и всхожесть семян наблюдалось при воздействии экстрактом 5 % концентрации, при этом длина проростков *S. europaee* составила $0,55 \pm 0,1$ (см), что на 33 % меньше, чем в контроле, а всхожесть семян оказалась меньше на 17 %, чем в контроле (табл.2, рис. 2).

При воздействии водных экстрактов из соцветий *H. verrucifera* на прорастание семян тест-объекта наблюдалась аналогичная тенденция увеличения показателей длины проростков *S. europaee* при снижении концентрации аллелопатически активных веществ *H. verrucifera* от $0,45 \pm 0,1$ (см) (10 % концентрация) до $0,65 \pm 0,1$ (см) (1 % концентрация) (табл. 2). В данной серии биотестов при увлажнении водными экстрактами *H. verrucifera* минимальная всхожесть семян *S. europaee* составила 30 % при 10 % концентрации экстракта, максимальная 63 % – при увлажнении водным экстрактом 1 % и 5 % концентрации, что было идентичным прорастанию в контроле (рис. 2).

Аллелопатически активные вещества, содержащиеся в водных экстрактах органов *H. verrucifera*, оказывают ингибирующее влияние на формирование биомассы проростков. При сравнении влияния экстрактов различных органов *H. verrucifera* установлены:

- минимальные показатели биомассы проростков тест-объекта *S. prostrata* при увлажнении водным экстрактом соцветий *H. verrucifera* концентрации 1 % – $4,0 \pm 0,2$ (мг) и максимальные $5,6 \pm 0,2$ (мг) – при увлажнении водным экстрактом стеблей *H. verrucifera*;
- минимальные показатели биомассы проростков тест-объекта *S. europaee* при увлажнении водным экстрактом листьев *H. verrucifera* концентрации 1 % – $0,7 \pm 0,01$ (мг) и максимальные $2,6 \pm 0,2$ (мг) – при увлажнении водным экстрактом соцветий *H. verrucifera*.

Таблица 2

Динамика роста проростков *Salicornia europaea* L. при увлажнении водными экстрактами *Halimione verrucifera* (M.Bieb.) Aellen разных концентраций

День эксперимента	Длина проростков <i>Salicornia europaea</i> L., см			
		Концентрация экстракта		
	контроль	1%	5%	10%
		Экстракт из листьев		
3	0,40±0,05	0,20±0,04	0,20±0,05	0,13±0,03
6	0,60±0,10	0,35±0,07	0,44±0,10	0,18±0,04
8	0,75±0,10	0,50±0,10	0,50±0,10	0,20±0,05
10	0,82±0,10	0,57±0,10	0,60±0,10	0,20±0,05
		Экстракт из корней		
3	0,40±0,05	0,20±0,02	0,30±0,03	0,30±0,04
6	0,60±0,10	0,60±0,10	0,60±0,10	0,40±0,06
8	0,75±0,10	0,70±0,10	0,65±0,10	0,45±0,10
10	0,82±0,10	0,90±0,10	0,75±0,10	0,50±0,10
		Экстракт из стеблей		
3	0,40±0,05	0,30±0,02	0,20±0,02	0,22±0,03
6	0,60±0,10	0,50±0,10	0,40±0,05	0,45±0,10
8	0,75±0,10	0,53±0,10	0,46±0,07	0,58±0,10
10	0,82±0,10	0,70±0,10	0,55±0,10	0,63±0,10
		Экстракт из соцветий		
3	0,40±0,05	0,23±0,02	0,14±0,02	0,24±0,04
6	0,60±0,10	0,37±0,04	0,31±0,06	0,30±0,06
8	0,75±0,10	0,48±0,07	0,32±0,06	0,40±0,06
10	0,82±0,10	0,65±0,10	0,50±0,10	0,45±0,10

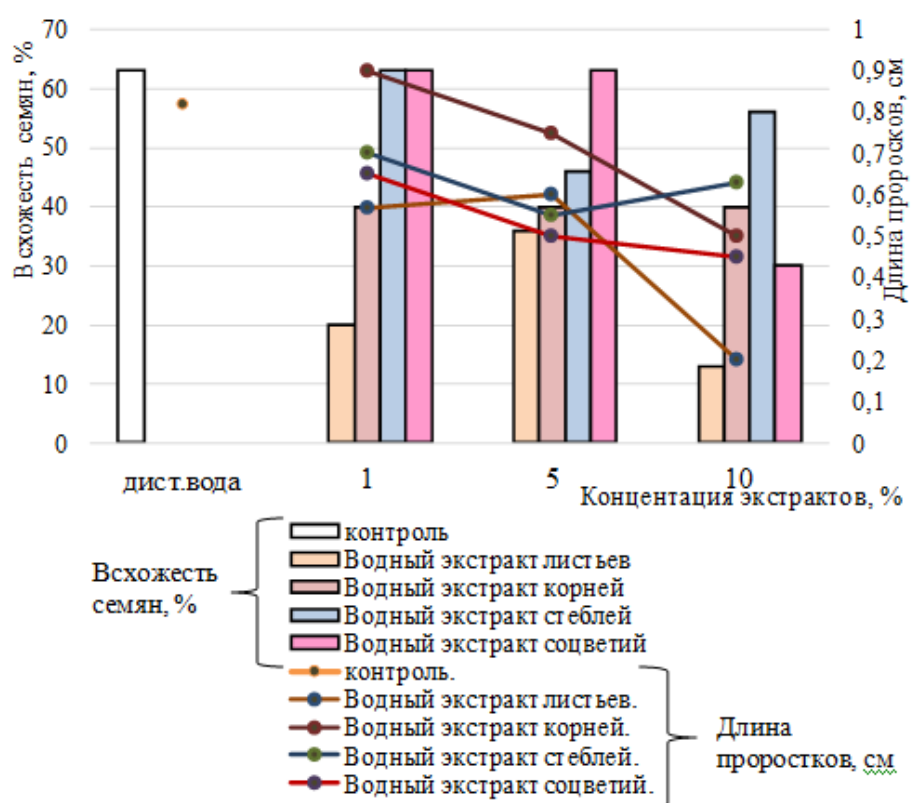


Рис. 2. Влияние аллелопатически активных веществ *Halimione verrucifera* (M. Bieb.) Aellen разных концентраций на всхожесть семян и рост проростков *Salicornia europaea* L.

При увеличении концентраций аллелопатически активных веществ *H. verrucifera* отмечено снижение показателей биомассы проростков тест-объектов *S. prostrata* и *S. europaea*.

В ходе исследования установлен аллелопатический порог чувствительности тест-объектов *S. prostrata* и *S. europaea* – минимальная концентрация (1 % водный экстракт) физиологически активных веществ *H. verrucifera*, выше которой начинается угнетение прорастания семян и роста проростков растений-акцепторов *S. prostrata* и *S. europaea*. Всхожесть семян тест-объекта *S. prostrata* при увлажнении водными экстрактами *H. verrucifera* 1 % концентрации из листьев составила – 51 %, корней – 82 %, стеблей – 76 %, соцветий – 64 %, что на 8–39 % ниже, чем в контроле. Всхожесть семян тест-объекта *S. europaea* при увлажнении водными экстрактами органов *H. verrucifera* 1 % концентрации из листьев составила – 20 %, корней – 40 %, стеблей – 63 %, соцветий – 63 %, что на 0,2–43 % ниже, чем в контроле (рис. 1).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Растения *Suaeda prostrata* Pall., обладают более низкой толерантностью к аллелопатическому влиянию *Halimione verrucifera* (M. Bieb.) Aellen, чем *Salicornia europaea* L.
2. Водорастворимые выделения *Halimione verrucifera* (M. Bieb.) Aellen оказывают ингибирующее воздействие при 5–10 % концентрациях экстрактов из растений и стимулирующее действие при 1 % концентрации экстрактов на прорастания семян и роста проростков *Suaeda prostrata* Pall. и *Salicornia europaea* L.
3. Водорастворимые вещества претерпевают изменения при повышении температуры окружающей среды.

Список литературы

1. Гиляров М. С. Биология. Большой энциклопедический словарь / М. С. Гиляров. – М.: Большая Российская энциклопедия, 1999. – 864 с.
2. Дудченко Л. Г. Пряно – ароматические и пряно – вкусовые растения / Л. Г. Дудченко, А. С. Козьяков, В. В. Кривенко. – Киев: Наукова думка, 1989. – 304 с.
3. Гродзинский А. М. Аллелопатия растений и почвоутомление / А. М. Гродзинский. – Киев: Наукова думка, 1991. – 430 с.
4. Eljarrat E. Sample handling and analysis of allelochemical compounds in plants / E. Eljarrat, D. Barcelo // Trends Anal. Chem. – 2001. – Vol. 20. – P. 584–590.
5. Mukerji K. G. Allelochemicals: biological control of plant pathogens and diseases / K. G. Mukerji. – Springer, 2006. – 208 p.
6. Blanco J. A. The representation of allelopathy in ecosystemlevel forest models / J. A. Blanco// Ecol. Modell. – 2007. – Vol. 209. – P. 65–77.
7. Reigosa M. J. Multifaceted approach to study allelochemicals in an ecosystem / M. J. Reigosa, N. Pedrol // Allelopathy: from molecules to ecosystems. Plymouth: Science Publishers Inc. – 2002. – Vol. 120. – P. 271–276.
8. Jose S. Belowground ecological interactions in mixed-species forest plantations / S. Jose, R. Williams, D. Zamora // For. Ecol. Manage. – 2006. – Vol. 233. – P. 231–239.
9. Ehlers B. K Soil microorganisms alleviate the allelochemical affects of a thyme monoterpene on the performance of an associated grass species / B. K Ehlers // PLoS One. – 2011. – Vol. 6 (11).– P. e26321.
10. Kadereit G. Molecular phylogeny of Atripliceae (*Chenopodioideae*, *Chenopodiaceae*): Implications for systematics, biogeography, flower and fruit evolution, and the origin of C4 Photosynthesis / G. Kadereit, E. V. Mavrodiev, E. H. Zacharias, A. P. Sukhorukov // In: American Journal of Botany. – 2010. – Vol. 97(10). – P. 1664–1687.
11. Mohlenbrock R. H. Flowering plants: pokeweeds, four-o'clocks, carpetweeds, cacti, purslanes, goosefoots, pigweeds, and pinks / R. H. Mohlenbrock. – Southern illinois university press, 2001. – 297 p.
12. Саксонов С. В. Фиторазнообразие восточной Европы / С. В. Саксонов, В. Б. Голуб, О. А. Задульская [и др.] // Институт экологии Волжского бассейна РАН № 1. – 2006. – С.176–211.
13. Гродзинский А. М. Экспериментальная аллелопатия / А. М. Гродзинский, Г. П. Богдан, Э. А. Головки. – Киев: Наукова думка, 1987. – 226 с.
14. Лакин Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.
15. Шакирова Ф. М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция / Ф. М. Шакирова. – Уфа: Гилем. М., 2001. – 160 с.

CHARACTERISTICS OF ALLEOPATHIC ACTIVITY
HALIMIONE VERRUCIFERA (M.BIEB.) AELLEN WATER-SOLUBLE
SUBSTANCES UNDER THERMAL EXPOSURE

Ganusyak A. P., Simagina N. O., Pishchurova V. S.

V. I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Crimea, Russia
E-mail: golden-1392@mail.ru

Interspecific interactions of plants have great importance on the distribution of halophytic plant communities. The most sensitive step to the action of soil salinization is the process of seed germination. The decisive factor in this period may be influence of allelopathy, which determines the structure of the emerging plant community.

Allelopathy is a chemical interaction of plants through specific organic secretions. Moreover, secretions can have both inhibitory and stimulating effects.

At present, the allelopathic aspect of plant interaction under conditions of soil salinity has been insufficiently studied. An important theoretical and practical value is the identification of the role of allelopathy in the development and formation of halophytic communities.

This work is devoted to the study of the identification of allelopathic interactions in halophytic communities of the Republic of Crimea by determining the conservation of allelopathic activity during the transformation of substances using plant material that has undergone heat treatment. The study of allelopathy mainly in laboratory controlled conditions is due to the fact that many biotic and abiotic factors simultaneously influence this process in natural biocenoses, which complicates the interpretation of the results.

The series of biotests were carried for determinatoin of the the allelopathic properties of dried leaves, roots, stems, inflorescences of *Halimione verrucifera* (M. Bieb.) Aellen. Allelopathic effect of *H. verrucifera* was evaluated by the effect of aqueous extracts of various concentrations of 1 %, 5 %, 10 % on seed germination and growth of seedlings of test objects *Suaeda prostrata* Pall. and *Salicornia europaea* L.

According to the literature, it is known that substances undergo changes during heat treatment. In the study of the effect of aqueous extracts of dried parts of the aerial and underground organs of *H. verrucifera* of various concentrations on seed germination and seedling growth, different allelopathic tolerance was noted in test objects *S. prostrata* and *S. europaea*. Having determined the seed germination of the test objects *S. prostrata* and *S. europaea* in the control and experimental versions, it is possible to conclude that extracts from various organs of *H. verrucifera* have both inhibitory and stimulating effects at certain stages of seed germination and growth of *S. prostrata* seedlings and *S. europaea*.

As a result of the study, the allelopathic sensitivity threshold of the test objects *S. prostrata* and *S. europaea* was established – the minimum concentration (1 % aqueous extract) of physiologically active substances *H. verrucifera*, above which the inhibition of seed germination and growth of seedlings of *S. prostrata* acceptor plants begins and *S. europaea*. Seed germination of test object *S. prostrata* when moistened with aqueous extracts of *H. verrucifera* 1 % concentration from leaves was 51 %, roots 82 %, stems

76 %, inflorescences 64 %, which is 8–39 % lower than in control. Seed germination of test object *S. europaea* when moistened with water extracts of organs of *H. verrucifera* 1 % concentration from leaves was 20 %, roots 40 %, stems 63 %, inflorescences 63 %, which is 0.2–43 % lower than in control.

Keywords: seed germination, inhibition, extract, test object, allelopathy, *Halimione verrucifera* (M. Bieb.) Aellen, *Suaeda prostrata* Pall., *Salicornia europaea* L.

References

1. Gilyarov M. S. *Biology. Big Encyclopedic Dictionary*, 864 (M.: Big Russian Encyclopedia, 1999).
2. Dudchenko L. G., Koziakov A. S., Krivenko V. V. *Spicy – aromatic and spicy – flavoring plants* (Kiev: Naukova Dumka, 1989).
3. Grodzinsky A. M., *Allelopathy of plants and soil fatigue*, 430 (Naukova Dumka, Kiev, 1991).
4. Eljarrat E., Barcelo D. *Sample handling and analysis of allelochemical compounds in plants*, *Trends Anal. Chem.*, **20**, 584 (2001).
5. Mukerji K. G. Allelochemicals: biological control of plant pathogens and diseases, *Springer*, 208 (2006).
6. Blanco J. A. The representation of allelopathy in ecosystem-level forest models, *Ecol. Modell.*, **209**, 65 (2007).
7. Reigosa M. J., Pedrol N. Multifaceted approach to study allelochemicals in an ecosystem Allelopathy: from molecules to ecosystems, *Plymouth: Science Publishers Inc.*, **120**, 271 (2002).
8. Jose S., Williams R., Zamora D. Belowground ecological interactions in mixed-species forest plantations, *For. Ecol. Manage.*, **233**, 231 (2006).
9. Ehlers B. K. Soil microorganisms alleviate the allelochemical affects of a thyme monoterpene on the performance of an associated grass species, *PLoS One*, **6** (11), e26321 (2011).
10. Kadereit G., Mavrodiev E. V., Zacharias E. H., Sukhorukov A. P. Molecular phylogeny of Atripliceae (Chenopodioideae, Chenopodiaceae): Implications for systematics, biogeography, flower and fruit evolution, and the origin of C4 Photosynthesis, *In: American Journal of Botany*, **97**(10), 1664 (2010).
11. Mohlenbrock R.H. Flowering plants: pokeweeds, four-o'clocks, carpetweeds, cacti, purslanes, goosefoots, pigweeds, and pinks, *Southern illinois university press*, 297 (2001).
12. Saxonov S. V., Golub V. B., Zadulskaya O. A. Phyto-diversity of Eastern Europe, *Volga Basin Institute of Ecology RAS*, **1**, 176 (2006).
13. Grodzinsky A. M., Bogdan G. P., Golovko E. A., *Experimental allelopathy*, 226 (Naukova Dumka, Kiev, 1987).
14. Lakin G. F. *Biometrics*, 293 p. (Higher School, Moscow, 1990).
15. Shakirova F. M. *Nonspecific resistance of plants to stress factors and its regulation* (Ufa: Guillem. M, 2001).

УДК 577.112:612

РОЛЬ ТЕМПЕРАТУРНОГО ФАКТОРА В ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ ПРОТЕИНОВ И МЕТГЕМОГЛОБИНООБРАЗОВАНИИ В ЭРИТРОЦИТАХ В УСЛОВИЯХ РАЗВИТИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

Коношенко С. В.¹, Большакова А. А.¹, Елкина Н. М.², Казакова В. В.²,

Загноенко Н. Е.²

¹*Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», Симферополь, Республика Крым, Россия*

²*Медицинская академия имени С. И. Георгиевского (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», Симферополь, Республика Крым, Россия*

E-mail: nataleiolkina@gmail.com

Показано, что с повышением температуры от 4 °С до 37 °С в эритроцитах возрастает интенсивность окислительной модификации протеинов. Наблюдается смещение этих процессов в направлении большего образования альдегидных и кетонных продуктов окислительной модификации нейтрального характера. Вместе с этим, в условиях окислительного стресса повышение температуры способствует интенсификации метгемоглобинообразования.

Ключевые слова: эритроциты, окислительный стресс, окислительная модификация протеинов, метгемоглобинообразование.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из проблем биологии и медицины является выяснение молекулярных основ развития окислительного стресса, влияние на эти процессы факторов различной природы. Развитие окислительного стресса осуществляется при многих заболеваниях, что связано с нарушением прооксидантно-антиоксидантного равновесия и усиленным генерированием активных форм кислорода (АФК). Под действием активных форм кислорода в клетках организма осуществляются различные деструктивные изменения в частности, окислительная модификация протеинов [1–3]. Ряд работ [4–7] свидетельствует о том, что при многих заболеваниях в патологический процесс вовлекаются эритроциты. Учитывая, что образование метформы гемоглобина связано с генерированием АФК, можно предположить вполне очевидную связь между процессом окислительной модификации протеинов, в частности гемоглобина, и метгемоглобинообразованием.

В настоящее время остаётся недостаточно изученным вопрос о влиянии на процессы окислительной модификации протеинов и метгемоглобинообразование такого фактора как температура.

В связи с этим, целью данной работы являлось изучение роли температурного фактора в окислительной модификации протеинов и метгемоглобинообразовании в эритроцитах в условиях развития окислительного стресса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили эритроциты практически здоровых людей (25 человек, средний возраст 38,0 лет). Кровь брали на базе ГБУЗ РК «Центр крови», г. Симферополь. Эритроциты гемолизировали по методу Драбкина [8]. В гемолизате эритроцитов определяли содержание продуктов окислительной модификации протеинов, используя биохимический метод, основанный на спектрофотометрической идентификации 2,4 – динитрофенилгидразонов аминокислотных остатков, представляющих собой альдегидные и кетонные производные аминокислот нейтрального и основного характера, при длинах волн 356 нм, 370 нм, 430 нм и 530 нм [9]. Содержание метгемоглобина в гемолизате эритроцитов определяли по методу, описанному в литературе [10].

В целях моделирования окислительного стресса эритроциты инкубировали в среде Фентона, содержащей 10 мМ FeSO₄ и 3 мМ H₂O₂, в течение 2,4 и 6 часов при температуре 4 °С и 37 °С. Полученные данные обрабатывали статистически с применением t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали результаты исследования при инкубации эритроцитов в среде Фентона при 4 °С в течение 2-х часов наблюдается тенденция к увеличению содержания в гемолизате эритроцитов альдегидных и кетонных продуктов окислительной модификации протеинов как основного, так и нейтрального характера (табл. 1).

Более длительная инкубация эритроцитов в этих условиях, в течение 4-х и 6-ти часов, приводила к существенному увеличению всех спектрофотометрически идентифицированных продуктов окислительной модификации протеинов (табл. 1). Через 4 часа инкубации эритроцитов содержание альдегидных и кетонных продуктов нейтрального характера увеличивалось на 31,0 % и 37,4 % по сравнению с контролем, содержание альдегидных и кетонных продуктов основного характера возрастало на 20,3 % и 52,6 %, соответственно. Через 6 часов инкубации эритроцитов в среде Фентона наблюдалось дальнейшее увеличение уровня содержания продуктов окислительной модификации протеинов: альдегидных и кетонных продуктов нейтрального характера в 1,7 раза, альдегидных и кетонных продуктов основного характера в 1,4 раза и в 1,9 раза по сравнению с контролем.

Таблица 1

Содержание продуктов окислительной модификации протеинов (ОМП) в гемолизате эритроцитов в условиях моделирования окислительного стресса in vitro при t 4 °C (M±m)

Объект исследования	Содержание продуктов ОМП, ед.опт. пл.			
	Нейтрального характера		Основного характера	
	Альдегиды, 356 нм	Кетоны, 370 нм	Альдегиды, 430 нм	Кетоны, 530 нм
Контроль (эритроциты до инкубации в среде Фентона)	1,03 ± 0,15	1,07 ± 0,14	1,33 ± 0,14	0,38 ± 0,07
Эритроциты, инкубированные в среде Фентона в течение: 2-х часов	1,09 ± 0,08	1,15 ± 0,10	1,45 ± 0,15	0,42 ± 0,08
4-х часов	1,35 ± 0,10 *	1,47 ± 0,12 *	1,60 ± 0,15	0,58 ± 0,08 *
6-ти часов	1,70 ± 0,15 *	1,82 ± 0,14 *	1,84 ± 0,13 *	0,73 ± 0,10 *

Примечание: * – достоверность различия показателя по сравнению с контролем (p< 0,05).

При инкубации эритроцитов в среде Фентона при температуре 37 °C процессы окислительной модификации протеинов осуществлялись гораздо более интенсивно, о чём свидетельствуют данные, представленные в табл. 2.

Так, через 2 часа инкубации эритроцитов содержание альдегидных и кетонных продуктов нейтрального характера достоверно возрастало в 1,6 и в 1,5 раза, соответственно, по сравнению с контролем; содержание альдегидных и кетонных продуктов основного характера увеличивалось на 13,5 % и 21,0 % по сравнению с контролем. Различия в содержании продуктов окислительной модификации протеинов основного характера проявлялись на уровне тенденции.

Через 4 часа инкубации эритроцитов в среде Фентона содержание альдегидных и кетонных продуктов нейтрального характера увеличивалось в 2,5 и в 2,0 раза по сравнению с контролем; содержание альдегидных и кетонных продуктов основного характера возрастало в 2,0 и в 1,9 раза, соответственно. Через 6 часов инкубации эритроцитов наблюдалось некоторое снижение уровня продуктов окислительной модификации протеинов по сравнению с предыдущими значениями показателей (4 часа инкубации). Тем не менее, содержание альдегидных и кетонных продуктов нейтрального характера превышало уровень контроля в 1,7 и в 1,8 раза, а содержание альдегидных и кетонных продуктов основного характера превышало уровень контроля в 1,5 раза.

Наблюдаемое нами снижение уровня содержания продуктов окислительной модификации протеинов через 6 часов инкубации эритроцитов в среде Фентона можно объяснить глубокими деструктивными процессами, связанными с

возможным распадом белковых молекул и дальнейшим удалением их некоторой доли в процессе эксперимента (отмывание протеинового осадка этилацетатно-спиртовой смесью).

Таблица 2

Содержание продуктов окислительной модификации протеинов (ОМП) в гемолизате эритроцитов в условиях моделирования окислительного стресса in vitro при t 37 °C (M±m)

Объект исследования	Содержание продуктов ОМП, ед.опт. пл.			
	Нейтрального характера		Основного характера	
	Альдегиды, 356 нм	Кетоны, 370 нм	Альдегиды, 430 нм	Кетоны, 530 нм
Контроль (эритроциты до инкубации в среде Фентона)	1,03 ± 0,15	1,07 ± 0,14	1,33 ± 0,14	0,38 ± 0,07
Эритроциты, инкубированные в среде Фентона в течение: 2-х часов	1,62 ± 0,27 *	1,63 ± 0,23 *	1,51 ± 0,14	0,46 ± 0,08
4-х часов	2,55 ± 0,27 *	2,26 ± 0,17 *	2,63 ± 0,33 *	0,71 ± 0,09 *
6-ти часов	1,78 ± 0,19 *	1,92 ± 0,13 *	1,98 ± 0,16 *	0,59 ± 0,04 *

Примечание: * – достоверность различия показателя по сравнению с контролем (p < 0,05).

Сопоставляя данные, полученные при инкубации эритроцитов в среде Фентона при 4 °C и 37 °C можно отметить, что при более высокой температуре процессы окислительной модификации протеинов приобретает более высокий уровень интенсивности. Поскольку окислительная модификация протеинов осуществляется под действием активных форм кислорода, главным образом, радикальной природы, вполне правомерно сделать предположение о том, что температурный фактор является одним из тех, которые влияют на генерирование АФК не только в эритроцитах, но и в других биологических средах.

Определенный интерес представляет также тот факт, что при температуре 4 °C интенсивность образования альдегидных и кетонных продуктов как нейтрального, так и основного характера была практически одинакова, тогда как при 37 °C проявляется более выраженное образование продуктов окислительной модификации протеинов нейтрального характера. На основании этого можно предположить, что с повышением температуры возрастает внутримолекулярная динамика протеинов и в результате таких изменений более глубокие участки белковых молекул, в которых возрастает присутствие неполярных аминокислотных участков, становятся более уязвимыми для действия АФК.

Учитывая, что в эритроцитах из всех органических компонентов, в том числе и протеинов, основное содержание приходится на гемоглобин, представляло интерес оценить влияние температуры на процесс метгемоглибинообразования в условиях моделирования окислительного стресса. Изучение этого вопроса позволило получить данные, представленные в табл. 3.

Как видно из данных табл.3, при инкубации эритроцитов в среде Фентона при температуре 4 °С в течение 2-х, 4-х и 6-ти часов прослеживается незначительное увеличение содержания метгемоглобина в гемолизатах, что проявляется, в основном, на уровне тенденции, за исключением 6-ти часового периода инкубации (показано достоверное увеличение уровня метгемоглобина: на 41,7 % по сравнению с контролем).

При инкубации эритроцитов в среде Фентона при температуре 37 °С образование метгемоглобина было более выраженным: через 2 часа инкубации эритроцитов уровень метгемоглобина возрастал на 21,0 %, через 4 часа инкубации – на 38,0 %, а через 6 часов инкубации – на 67,0 % по сравнению с контролем.

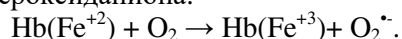
Таблица 3

Содержание метгемоглобина в гемолизате эритроцитов в условиях моделирования окислительного стресса *in vitro* при температуре 4°С и 37°С (M±m)

Объект исследования	Содержание метгемоглобина, %	
	t = 4 °С	t = 37 °С
Контроль (эритроциты до инкубации в среде Фентона)	2,4 ± 0,2	2,4 ± 0,2
Эритроциты, инкубированные в среде Фентона в течение: 2-х часов	2,5 ± 0,1	2,9 ± 0,1 *
4-х часов	2,8 ± 0,2	3,3 ± 0,1 *
6-ти часов	3,4 ± 0,1 *	4,0 ± 0,2 *

Примечание: * – достоверность различия показателя по сравнению с контролем (p< 0,05).

Из литературы известно [11], что переход гемоглобина в метгемоглобин сопровождается образованием одной из наиболее реакционной формы АФК – супероксиданиона:



В условиях среды, интенсивно генерирующей АФК, процесс образования метгемоглобина может существенно стимулироваться.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании результатов исследований можно сделать следующие выводы:

1. С повышением температуры от 4 °С до 37 °С в эритроцитах возрастает интенсивность окислительной модификации протеинов, о чём свидетельствует

более выраженное образование альдегидных и кетонных продуктов модификации как нейтрального, так и основного характера.

2. Повышение температуры сдвигает процессы окислительной модификации протеинов в эритроцитах в направлении большего образования альдегидных и кетонных продуктов нейтрального характера, что может быть связано с увеличением доступности более глубоких участков белковых молекул для действия АФК.
3. В условиях окислительного стресса в эритроцитах усиливается метгемоглобинообразование, интенсивность которого существенно возрастает с повышением температуры.

Список литературы

1. 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.
2. Меньшикова Е. Б. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты / Меньшикова Е. Б. – М.: Фирма «Слово», 2006. – 556 с.
3. Азизова О. А. Взаимосвязь маркёров окислительного стресса с клиническим течением хронической ишемии мозга / О. А. Азизова // Журн. неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. – 2013. – №9. – С. 21–27.
4. Novgorodtseva T. P. Modifications of the fatty acids composition of the erythrocyte membrane in patients with chronic respiratory diseases / T. P. Novgorodtseva, Y. K. Denisenko, N. N. Zhukova et al // Lipids Health Dis. – 2013. – №2. – P. 117–121.
5. Коношенко С. В. Особливості окислювальної модифікації протеїнів в еритроцитах хворих на кардіоміопатію, ішемічну хворобу серця, еритремію та апластичну анемію / С. В. Коношенко, Н. М. Йолкіна // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2013. – №2. – С. 40–43.
6. Елкина Н. М. Процессы пероксидации липидов, метгемоглобинообразования и генерирования активных форм кислорода в эритроцитах больных эритремией / Н. М. Елкина // Уч. записки Таврического нац. ун-та им. В. И. Вернадского. Сер.: Биология, химия. – 2013. – Т. 26 (65), №4. – С. 39–43.
7. Елкина Н. М. Состояние антиоксидантной системы в эритроцитах при активных гематологических и сердечно-сосудистых заболеваниях / Н. М. Елкина, С. В. Коношенко // Уч. записки Таврического нац. ун-та им. В. И. Вернадского. Сер.: Биология, химия. – 2015. – Т. 1(67), №3. – С. 14–20.
8. Drabkin D. A simplified technique for large scale crystallization of myoglobin and hemoglobin in the crystalline / D. Drabkin // Arch. Biochem. – 1959. – №21. – P. 224–226.
9. Дубинина Е. Е. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод её определения / Е. Е. Дубинина, С. О. Бурмистров, Д. А. Ходов и др. // Вопросы мед. химии. – 1996. – Т. 41, № 1. – С. 24–26.
10. Биохимические методы исследования в клинике / Под ред. А. А. Покровского. – М.: Медицина, 1969. – С. 28–30.
11. Дубинина Е. Е. Активность супероксиддисмутазы и содержание метгемоглобина в эритроцитах человека и животных / Е. Е. Дубинина, Л. А. Данилова, Л. Ф. Ефимова и др. // Журн. эволюционной биохимии и физиологии. – 1988. – Т. 24, Вып.4. – С. 532–540.

**THE ROLE OF THE TEMPERATURE FACTOR IN THE OXIDATIVE
MODIFICATION OF PROTEINS AND METHEMOGLOBIN FORMATION IN
ERYTHROCYTES UNDER CONDITIONS OF OXIDATIVE STRESS**

Konoshenko S. V., Bolshakova A. A., Yolkina N. M., Kazakova V. V., Zagnoenko N. E.

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

One of the problems of biology and medicine is the elucidation of the molecular basis for the development of oxidative stress, the influence of factors of various natures on these processes. It is known that the development of oxidative stress occurs in many diseases, which is enhanced by the formation of reactive oxygen species that attack various organic compounds, including proteins [1–3]. At the same time, a number of studies indicate that in diseases characterized by the development of oxidative stress, in the pathological process involved erythrocytes [4–6].

In this regard, the aim of this work was to study the role of the temperature factor in the oxidative modification of proteins and methemoglobin formation in erythrocytes under conditions of the development of oxidative stress.

The materials for the study were erythrocytes of healthy subjects (25 persons, middle age 38.0 years).

The erythrocytes were hemolysed by distilled water. In hemolysates the content of proteins oxidative modification products was determined by spectrophotometrically recording them at 356 nm, 370 nm, 430 nm and 530 nm [7]; the content of methemoglobin was determined also [8]. Oxidative stress modeling was by using of Fenton's medium, in which erythrocytes were incubated during 2, 4, and 6 hours at the temperature of 4° C and 37 °C.

It has been shown that when erythrocytes were incubated in Fenton's medium at 4° C during 2 and 4 hours, a slight increasing of the level of proteins modification products was observed, after 6 hours the level of neutral and basic aldehyde and ketone products was raised at 1.7 times.

When the erythrocytes were incubated in Fenton's system at the temperature of 37 °C a more significant increasing of the level of proteins modification products was observed: after 2 hours of incubation – at 1.4 times; after 4 hours of incubation – at 2.0 times and after 6 hours – at 1.6 times.

At the same time, the content of methemoglobin was raised also. When the erythrocytes were incubated in Fenton's system at the temperature of 4 °C the increasing in the level of methemoglobin was noted only after 6 hours of incubation (at 1.4 times). When erythrocytes were incubated in this system at the temperature of 37 °C the increasing in methemoglobin level was more pronounced: after 2 hours – at 1.2 times, after 4 hours – at 1.4 times and after 6 hours – at 1.7 times, in middle.

These data evidence about that with increasing of temperature in erythrocytes the processes of proteins oxidative modification and methemoglobin formation are intensified.

Keywords: erythrocytes, oxidative stress, oxidative modification of proteins, methemoglobin formation.

References

1. Vladimirov Y. A., The active forms of oxygen and nitrogen: their importance for diagnoses, prophylactic and therapeutics, *Biochemistry*, **69**, **1**, 5 (2004).
2. Menshikova E. B., Oxidative stress. Pro-oxidants and antioxidants, 556 (Moscow, Firm " Word", 2006).
3. Azizova O. A., Korsakov S. S., Connection of oxidative stress markers with clinical properties of chronic ischemic of brain, *J. of neurology and psychiatry*, **9**, 21 (2013).
4. Novgorodtseva T. P., Denisenko Y. K., Zhukova N. N. et al, Modifications of fatty acids composition of the erythrocyte membrane in patients with chronic respiratory diseases, *Lipids Health Dis.*, **12**, 117 (2013).
5. Konoshenko S. V., Yolkina N. M., Peculiarities of proteins oxidative modification in erythrocytes of patients with cardiomyopathies, ischemic heart diseases, erythraemia and aplastic anemia, *Experimental and clinical physiology and biochemistry*, **2**, 40 (2013).
6. Yolkina N. M., Processes of lipids peroxidation, methemoglobin formation and oxygen active forms generation in erythrocytes of patients with erythraemia, *Sc. notes of V. I. Vernadsky Taurida university, Biology and Chemistry*, **20** (**65**), **4**, 39 (2013).
7. Yolkina N. M., Konoshenko S. V., Peculiarities of antioxidative system in erythrocytes under some hematological and heart-vascular diseases, *Sc. Notes of V. I. Vernadsky Taurida university, Biology and Chemistry*, **1** (**67**), **3**, 14 (2015).
8. Drabkin D. A., simplified technique for large scale crystallization of myoglobin and hemoglobin in the crystalline, *Arch. Biochem*, **21**, 226 (1959).
9. Dubinina E. E., Burmistrov S. O., Hodov D. A. et al, Oxidative modification of proteins in human serum of blood, method of determination, *Vopr. Med. Chem.*, **41**, **1**, 24 (1996).
10. Picrovsky A. A., *Biochemical methods of investigations in clinic*, 28 (Moscow, Medicine, 1969).
11. Dubinina E. E., Activity superoxide dismutase and the content of methemoglobin in erythrocytes of humans and animals, *J. of evolutionary biochemistry and physiology*, **4** (**24**), 540 (1988).

УДК 579.64:581.1:60

**АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ СУСПЕНЗИОННЫХ
КУЛЬТУР КАТРАНА ПРИМОРСКОГО (*CRAMBE MARITIMA* L.)
ОТНОСИТЕЛЬНО ШТАММОВ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ
*BACILLUS THURINGIENSIS***

Крыжко А. В.¹, Бугара И. А.², Омельченко А. В.², Кузнецова Л. Н.¹, Горелова В. В.¹

¹ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма», Симферополь,
Республика Крым, Россия

²Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный
университет имени В. И. Вернадского», Симферополь, Республика Крым, Россия
E-mail: solanum@ukr.net

Проведенные исследования позволили выявить штаммы *B. thuringiensis*, перспективные для применения против листогрызущих вредителей в агроценозах востребованной сельскохозяйственной культуры катрана приморского *Crambe maritima* L., обладающей высокой антибактериальной активностью. Полученные результаты открывают перспективу разработки биопрепаратов нового поколения на основе совместного использования суспензионной культуры катрана приморского и энтомопатогена *B. thuringiensis*. Степень влияния содержащих антимикробные вещества суспензионных культур *C. maritima* на бактериальные культуры энтомопатогенных штаммов *B. thuringiensis* зависит как от состава питательных сред, используемых для получения культур растительных клеток, так и от штамма бактерий.

Ключевые слова: *Crambe maritima* L., суспензионная культура, антибактериальное действие, *Bacillus thuringiensis*.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время актуальной проблемой является разработка способов защиты растений, основанных на совместном применении биоагентов, препаратов, обладающих высокой инсектицидной, бактерицидной и антифунгальной активностью [1, 2]. Такой прием может обеспечить высокий выход качественной, экологически безопасной агрономической продукции.

Одним из перспективных источников фитобиотиков в качестве биологического средства защиты растений является катран приморский *Crambe maritima* L., многолетнее травянистое растение семейства Крестоцветных. Интерес к практическому применению *C. maritima* основан на биохимических особенностях вида, связанных с содержанием потенциально антимикробных глюкозинолатов (GSL), основным из которых является эипрогоитрин. Содержание эипрогоитрина в этиолированных проростках достигает 80–85 % и 95 % в семенах. Также в проростках идентифицированы шесть других GSL (прогоитрин, глюконапин, глюкобрасикапан, синалбин, глюконастуртин и глюкобрасицин). Вместе с тем в

семенах были идентифицированы только пять GSL. В семенах, но не в этиолированных проростках, присутствовал и глюкоалиссин [3]. Катран приморский также содержит флавоноидные гликозиды, полученные из кемпферола (3-глюкозид, 3,4'-диглюкозид, 3-(*p*-кумарил) глюкозид-4'-глюкозид), 3-(2-гидроксипропионил) глюкозид-4'-глюкозид) и кверцетина (3-глюкозид, 3,4'-диглюкозид, 3-ферулоилглюкозид-4'-глюкозид, 3-малонилглюкозид-4'-глюкозид). Дополняют вторичные метаболиты *C. maritima* фитоалексины, такие как камалексин и брассинин. Проведенные исследования подтвердили противогрибковые эффекты этих двух фитоалексинов *in vitro* на развитие *Alternaria spp.* на разных стадиях роста [6].

В современной системе защиты сельскохозяйственных культур от листогрызущих вредителей с успехом используются биопрепараты на основе энтомопатогенных бактерий *B. thuringiensis*, способных формировать при споруляции параспоральные кристаллические включения белковой природы, обуславливающие, главным образом, ее активность [4, 5]. Биоинсектициды на основе штаммов *B. thuringiensis* являются перспективными для использования в агроценозах *C. maritima*, так как для данного вида растений характерно наличие листогрызущих вредителей – *Pieris brassicae* L., *P. rapae* L.

Необходимо учитывать, что при внесении *B. thuringiensis* в агроэкосистемы на энтомопатогены влияют такие внешние факторы как фитонциды и экстрактивные вещества растений, способные не только подавлять их рост, но и влиять на развитие [6]. Известно, что под действием экстрактивных веществ кедр, ели и лиственницы при культивировании штаммов *B. thuringiensis* отмечали появление гигантских, веретеновидных, клостридиальных и нитевидных форм клеток. Экстрактивные вещества акации вызывали задержку роста бактерий на 24 часа, а клена и ореха – на 48 часов [7]. Под действием нелетучих веществ капусты происходит задержка образования белковых кристаллов *B. thuringiensis* на 2–3 дня [8].

Исходя из вышеизложенного, целью исследований было изучение влияния суспензионных культур *C. maritima* на рост и развитие бактерий штаммов *B. thuringiensis* из Крымской коллекции микроорганизмов ФГБУН «Научно-исследовательского института сельского хозяйства Крыма».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальная часть работы выполнена на базе лаборатории энтомопатогенных микроорганизмов отдела сельскохозяйственной микробиологии ФГБУН «Научно-исследовательского института сельского хозяйства Крыма» и лаборатории биотехнологии и генной инженерии растений кафедры ботаники и физиологии растений и биотехнологий Таврической академии (структурного подразделения) ФГАОУ ВО Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского.

Для получения суспензионной культуры *C. maritima* использовали каллусные культуры III-пассажа, индуцированные из листовых эксплантов [9]. В ламинарном боксе MSC Advantage™ Thermo Fisher Scientific взвешивали 35 мг каллусной ткани и помещали в жидкие питательные среды Мурасиге и Скуга (МС) [10] без CaCl₂,

объемом 30 мл, содержащие 0,5 мг/л 6-бензиламинопурина (6-БАП), 0,5 мг/л кинетина и 1,0 мг/л 6-БАП, 0,5 мг/л кинетина, 0,1 мг/л индолилуксусной кислоты (ИУК), обозначенные, соответственно, как МС-12 и МС-13, разлитые в колбы Эрленмейера объемом 100 мл. Культивировали клеточную суспензию *C. maritima* в орбитальном шейкере MaxQ™ 4000 Thermo Fisher Scientific при 110 оборотах в минуту и температуре 26 °С в течение 30 суток [11].

Определяли антибиотическую активность суспензионной культуры *C. maritima* относительно жидких споровых культур штаммов *B. thuringiensis* 792, 888, 994, 0162, 0279, 0428 и 0578. Работу проводили в лабораторных условиях по методу Е. М. Данини [12]. Микробную взвесь штаммов бактерий с титром спор $2,3-4,6 \cdot 10^7$, высевали на поверхность РПА (рыбо-пептонный агар) в количестве 0,1 мл. Питательную среду, в которой культивировались клетки суспензионной культуры *C. maritima*, разливали в лунки по 0,1 мл. Контролями служили чашки с питательной средой РПА, засеянными культурами штаммов *B. thuringiensis* без лунок. Опытные и контрольные чашки Петри выдерживали в термостате при температуре 27–28 °С в течение 3–4 суток.

Оценку действия суспензионной культуры *C. maritima* проводили по зоне задержки роста колоний бактерий и непосредственно по количеству колоний в опытных и контрольных чашках Петри. Исследование культурально-морфологических свойств колоний *B. thuringiensis* проводилось согласно общепринятым методам [13, 14].

Статистический анализ результатов исследований проводили с использованием Microsoft Excel и пакета прикладных программ Statistica 7 [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что суспензионные культуры *C. maritima* обладают антибактериальной активностью по отношению к ряду штаммов энтомопатогенных бактерий *B. thuringiensis*, однако степень ее активности зависит от состава питательной среды, на которой суспензионная культура выращивалась (табл. 1). Наиболее токсичными для штаммов бактерий оказались суспензионные культуры, выращенные на питательной среде МС-13, содержащей фитогормоны ауксиновой и цитокининовой природы в соотношении 2:1. В варианте со штаммами *B. thuringiensis* 0162 и 0279 количество колоний, образовавшихся на чашках с суспензионной культурой, выращенной на данной питательной среде было соответственно в 7,1 и в 1,4 раза меньше, чем в контрольных (табл. 1).

У культур исследуемых штаммов, находящихся в зоне действия суспензионной культуры, изучали морфологию колоний. Макроскопическому анализу подвергали колонии, взятые из опытных вариантов в зоне угнетения роста, и сравнивали их с колониями из контрольных вариантов, не подвергавшихся воздействию суспензионной культуры.

Установлено, что под действием суспензионной культуры *C. maritima*, полученной на среде МС-13, исследуемые штаммы *B. thuringiensis* так же, как и в контрольных вариантах, образовывали круглые или неправильной формы колонии с

зубчатым краем. По консистенции колонии были вязкими, имели плоский рельеф с матовой, серовато-бежевого цвета поверхностью.

Таблица 1

Антибактериальная активность суспензионных культур *C. maritima* относительно бактерий *B. thuringiensis* (лабораторный опыт)

Штаммы <i>B. thuringiensis</i>	Количество колоний <i>B. thuringiensis</i> на РПА (10 ⁶)		
	Контроль	Питательные среды для получения суспензионной культуры <i>C. maritima</i>	
		МС-12	МС-13
792	41,7 ± 3,5	42,0 ± 3,2	35,0 ± 1,7
888	20,6 ± 3,7	27,3 ± 5,8	22,0 ± 3,4
994	27,3 ± 3,8	27,0 ± 5,2	30,0 ± 1,5
0162	463,3 ± 15,3	109,3 ± 9,6	65,0 ± 4,7
0279	31,0 ± 1,2	16,3 ± 1,3	22,3 ± 2,0
0428	30,6 ± 6,2	44,0 ± 2,5	39,3 ± 5,5
0578	35,3 ± 3,3	39,6 ± 3,5	36,0 ± 6,6

Штаммы же 994, 0162, 0279, колонии которых в контрольных чашках имели едва различимую, более светлую ареолу, под воздействием антибактериальных веществ *C. maritima*, формировали ярко выраженную ареолу и кратерообразный профиль. При микроскопировании колоний штаммов 0162 и 0279 на стадии развития вегетативных цепочек наблюдали увеличение количества вегетативных клеток в цепочках соответственно в 1,5 и 2,7 раз по сравнению с контролем. Кроме того, колонии опытных вариантов штамма 994 в пределах зон угнетения имели диаметр в 2,0 раза меньше контрольных. Колонии же штаммов *B. thuringiensis* 0162 и 0279, образовавшиеся в зоне угнетения суспензионной культуры *C. maritima*, полученной на питательной среде МС-13, существенно не отличались по размеру от контрольных (табл. 2).

При микроскопировании колоний штамма 994 на стадии развития вегетативных клеток (через 8–10 часов) отмечали увеличение количества клеток в цепочках (в 1,4 раза по сравнению с контролем). На 5-е сутки роста отмечали задержку в формировании спор и кристаллов. Культура остановилась в развитии на стадии спорообразования.

Культуры штаммов *B. thuringiensis* 0162 и 0279, образовавшиеся в зоне угнетения суспензионной культуры *C. maritima*, выращенной на средах МС-13, через пять суток культивирования, в сравнении с контрольными, характеризовались более активной динамикой формирования спор и кристаллов и процессом выхода спор из спорангиев в вегетативных клетках. Тогда как в контрольных вариантах в вегетативных клетках колоний штамма 0279 лишь фиксировали процесс активного формирования спор и белковых кристаллов эндотоксина, в вариантах с обработкой суспензионной культурой, уже могли наблюдать до 40 % свободных спор. В

культуре штамма 0162 в течение соответствующего периода в клетках колоний в контроле было отмечено до 40 % свободных спор, а в соответствующих опытных вариантах выход спор и кристаллов достигал 75 %.

Таблица 2

Влияние суспензионных культур катрана приморского (*C. maritima*) на диаметр колоний штаммов *B. thuriengensis* (лабораторный опыт)

Штаммы <i>B. thuringiensis</i>	Диаметр колонии штаммов <i>B. thuriengensis</i> на РПА, мм		
	Контроль	Питательные среды для получения суспензионной культуры <i>C. maritima</i>	
		МС-12	МС-13
994	16,2±1,9	7,2±0,5	8,0±0,8
0162	5,5±0,3	5,1±0,7	6,8±0,5
0279	8,8±1,6	9,4±0,8	7,3±0,8

Суспензионные культуры *C. maritima*, полученные на питательной среде МС-13, не оказывали какого-либо достоверного антибактериального эффекта на культуры штаммов *B. thuriengensis* 792, 888, 0578, 0428.

Суспензионные культуры, полученные на питательной среде МС-12, содержащей фитогормоны ауксиновой и цитокининовой природы в соотношении 1:1, были менее токсичными для исследованных штаммов *B. thuriengensis*.

Количество колоний штамма *B. thuriengensis* 0162, образовавшихся на чашках с добавлением по методу «колодцев» суспензионной культуры, выращенной на питательной среде МС-12 было в 4,3 раза меньше, чем в контрольных (табл. 1). Также суспензионная культура обладала в 4,9 раз меньшим, чем в контроле токсическим влиянием на жизнеспособность штамма *B. thuriengensis* 0279. Исследование культурально-морфологических свойств колоний штаммов 994, 0162, 0279 показало, что антибактериальные вещества суспензионной культуры *C. maritima*, полученной на МС-12 также, как и антибактериальные вещества суспензионной культуры, полученной на МС-13, способствовали формированию колоний с ярко выраженной ареолой и кратерообразным профилем. По остальным признакам колонии всех изученных штаммов не отличались от полученных на контрольных чашках.

Колонии штамма 994, под влиянием суспензионной культуры *C. maritima*, полученной на питательной среде МС-12 были в 2,25 раза меньше контрольных. При микроскопировании данных колоний на стадии развития вегетативных клеток отмечали различия в количестве клеток в цепочках контрольных и опытных вариантов. Так, в опытных вариантах количество клеток в цепочках было в 1,6 раз больше, чем в контрольных. Через пять суток культивирования в вегетационных клетках под влиянием суспензионной культуры наблюдали задержку выхода спор, в то время как в контроле выход спор составлял около 20 %.

Колонии штамма 0162 и 0279, образовавшиеся в зоне угнетения суспензионных культур *C. maritima* имели размеры, соответствующие размерам колоний

контрольных вариантов. Микроскопирование колоний штамма 0162 показало, что цепочки вегетативных клеток колоний, контактировавших с суспензионными культурами, выращенными на МС-12, также были типичными для культуры данного штамма. При микроскопировании колоний штамма 0279, наблюдали цепочки из вегетативных клеток в 1,8 раз длиннее, чем в контроле. В дальнейшем, через пять суток культивирования, в контрольных чашках с культурой штамма 0279 фиксировали процесс активного формирования спор и белковых кристаллов эндотоксина, тогда как в вариантах с обработкой суспензионной культурой, выращенной на среде МС-12, уже наблюдали 10 % выход спор. В контрольной культуре штамма 0162 было отмечено до 40 % свободных спор, а в соответствующих опытных вариантах – до 95 %.

Суспензионная культура *C. maritima*, полученная на питательной среде МС-12 также, как и культура, полученная на среде МС-13, не оказывали какого-либо достоверного антибактериального эффекта на культуры штаммов *B. thuringiensis* 792, 888, 0578, 0428.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано, что степень влияния содержащих антимикробные вещества суспензионных культур *C. maritima*, выращенных на питательных средах МС-12 и МС-13 на бактериальные культуры энтомопатогенных штаммов *B. thuringiensis* зависит как от состава питательных сред, используемых для получения культур, так и от штамма бактерий.

Установлено, что максимально устойчивыми к антимикробным веществам суспензионных культур *C. maritima* являются штаммы *B. thuringiensis* 792, 888, 0578 и 0428. Действию суспензионных культур подвержены бактериальные культуры штаммов 0162, 0279 и 994. Влияние суспензионных культур на бактерии данных штаммов в сравнении с соответствующими контрольными вариантами проявляется в изменении динамики прохождения фаз физиологического развития культур. Ускорение динамики развития характерно для культур штаммов 0162 и 0279, и наоборот, замедление развития - для культуры штамма 994.

Таким образом, полученные результаты показывают перспективность дальнейших исследований по совместному применению энтомопатогена *B. thuringiensis* и суспензионной культуры *C. maritima* при защите растений от фитопатогенов.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Минобрнауки России (№ 0562-2019-0001), регистрационный номер в ЦИТиС: АААА-А19-119022590066-3, а также проекта программы развития ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского» на 2015–2024 годы: «Разработка новой междисциплинарной модульной магистерской программы «Биотехнология, биохимия и биоинформатика»».

Список литературы

1. Yang G. Z. Facile Three-Component Synthesis, Insecticidal and Antifungal Evaluation of Novel Dihydropyridine Derivatives / G. Z. Yang, X. F. Shang, P. L. Cheng, X. D. Yin, J. K. Zhu, Y. Q. Liu, et al. // *Molecules*. – 2018. – Vol. 23(10). – P. 156–161.
2. Yun H. G. Entomopathogenic Fungi as Dual Control Agents against Both the Pest *Myzus persicae* and Phytopathogen *Botrytis cinerea* / H. G. Yun, D. J. Kim, W. S. Gwak, T. Y. Shin, S. D. Woo // *Mycobiology*. – 2017. – Vol. 45(3). – P. 192–198.
3. Anushree Sanyal Biological Flora of the British Isles: *Crambe maritima* / Anushree Sanyal, Guillaume Decocq // *Journal of Ecology*. – 2015. – Vol. 103. – P. 769–788.
4. Кандыбин Н. В. Микробиоконтроль численности насекомых и его доминанта *Bacillus thuringiensis* / Н. В. Кандыбин, В. Ф. Патыка, В. П. Ермолова, Т. И. Патыка // Инновационный центр защиты растений. – С. Петербург.: Пушкин. 2009. – 244 с.
5. Roh Jong Yul *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control / Roh, Jong Yul, Jae Young Choi, Ming Shun Li, Byung Rae Jin, Yeon Ho Je // *J. Microbiol. Biotechnol.* – 2007. – Vol. 17(4). – P. 547–559.
6. Крыжко А. В. Влияние фитонцидов и экстрактивных веществ душицы обыкновенной (*Origanum vulgare* L.) на культуру бактерий энтомопатогенного штамма *Bacillus thuringiensis* 0371 / А. В. Крыжко, Л. Н. Кузнецова, Е. Ф. Мягих // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. – 2017. – Т. 7, N 1. – С. 72–79.
7. Гукасян А. Б. Бактериостатическое и бактерицидное действие хвои и ее химических компонентов на возбудителя болезни сибирского шелкопряда / А. Б. Гукасян // *Изв. Сиб. отд. АН СССР*. – 1958. – № 7. – С. 174–188.
8. Кольчевский А. Г. Влияние фитонцидов растений, произрастающих в биоценозах капустных и картофельных полей на *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* шт. 202 / А. Г. Кольчевский // *Бюл. ВНИИ с.-х. микробиологии*. – 1981. – N 33. – С. 57–60.
9. Бугара И. А. Получение каллусных культур *Crambe maritima* L. и их цитологическая характеристика / И. А. Бугара, А. В. Омельченко, Е. В. Газель, К. О. Кирилин // *Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского, Биология. Химия*. – 2018. – Т. 4 (70). № 2. – С. 3–10.
10. Murashige T. The revised medium for rapid growth, and bioassays with tobacco tissue culture / T. Murashige, F. A. Skoog // *Physiol. Plant.* – 1962. – V. 15, № 13. – P. 473–497.
11. Калинин Ф. Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф. Л. Калинин, В. В. Сарнацкая, В. Е. Полищук – К.: Наукова думка, 1980. – 488 с.
12. Данини Е. М. Элементарные методики изучения антибактериальных свойств фитонцидов высших растений / Е. М. Данини // *Фитонциды, их роль в природе и значение для медицины*. М.: Изд-во АМН СССР, 1952. – 330 с.
13. Alexander Steve K. Laboratory exercises in organismal and molecular microbiology / Steve K. Alexander, Dennis Strete, Mary Jane Niles. – 1st ed. – 2004. – 362 p.
14. Практикум по микробиологии / А. И. Нетрусов, М. А. Егорова, Л. М. Захарчук и др.; Под ред. А. И. Нетрусова. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.
15. Халафян А. А. Современные статистические методы медицинских исследований: монография / А. А. Халафян – М.: ЛЕНАРД, 2014. – 320 с.

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF *CRAMBE MARITIMA* L. SPENSION CULTURES AGAINST THE STRAINS OF ENTOMOPATHOGENIC BACTERIA *BACILLUS THURINGIENSIS* BERLINER

Kryzhko A. V.¹, Bugara I. A.², Omelchenko A. V.², Kuznetsova L. N.¹, Gorelova V. V.¹

¹Research Institute of Agriculture of Crimea, Simferopol, Russia

²V.I. Vernadsky Crimea Federal University, Simferopol, Crimea, Russia

E-mail: solanum@ukr.net

Nowadays, the development of plant protection methods based on the joint use of biopreparations agents with complex high insecticidal and antifungal activity is an urgent problem. That's why study of the interactions between the suspension culture *Crambe maritima* L. as an antagonist of phytopathogens and *B. thuringiensis* as an entomopathogen, is of interest as a complex method of plant protection.

It is shown that the intensity of influence of antimicrobial substances of *C. maritima* suspension cultures on *B. thuringiensis* entomopathogenic strains depends both on the composition of the nutrient media and bacterial strain properties and resistance. *C. maritima* suspension cultures were obtained on Murashige and Skoog mediums without CaCl₂, which was differ in the content of auxin and cytokinin.

It was found that the strains of *B. thuringiensis* 792, 888, 0578 and 0428 are the most resistant to antimicrobial substances of the *C. maritima* suspension culture. Bacterial cultures of strains 0162, 0279 and 994 are exposed to the action of antimicrobial substances of suspension culture. The influence of suspension cultures on these strains in comparison with the corresponding control variants is shown in change of dynamics of passing by *B. thuringiensis* cultures the phases of physiological development. Acceleration of development dynamics was a characteristic for the strains 0162 and 0279, and slowdown of development – for the strain 994.

Thus, the research has allowed to identify the strains of *B. thuringiensis*, which is promising for use against leaf-eating pests in agrocenoses of the popular crop *C. maritima*, which has a high antibacterial activity. The obtained results open up the prospects for the development of a new generation of biological crop ptotection preparations based on the complex using of *C. maritima* suspension culture as an antagonist of phytopathogens and entomopathogenic bacteria *B. thuringiensis*.

Keywords: *Crambe maritima* L., suspension culture, antimicrobial activity, *Bacillus thuringiensis*.

References

1. Yang G. Z., Shang X. F., Cheng P. L., Yin X. D., Zhu J. K. and Liu Y. Q., Facile Three-Component Synthesis, Insecticidal and Antifungal Evaluation of Novel Dihydropyridine Derivatives, *Molecules*, **23**(10), 156 (2018).
2. Yun H. G. Kim D. J., Gwak W. S., Shin T. Y. and Woo S. D., Entomopathogenic Fungi as Dual Control Agents against Both the Pest *Myzus persicae* and Phytopathogen *Botrytis cinerea*, *Mycobiology*, **45**(3), 192 (2017).
3. Anushree Sanyal and Guillaume Decocq, Biological Flora of the British Isles: *Crambe maritima*, *Journal of Ecology*, **103**, 769 (2015).

4. Kandybin N. V., Patyka V. F., Ermolova V. P., and Patyka T. I. *Microbiological of insects and its dominant Bacillus thuringiensis*, 244 p. (St. Petersburg, Pushkin, 2009).
5. Roh Jong Yul, Jae Young Choi, Ming Shun Li, Byung Rae Jin, and Yeon Ho Je, Bacillus thuringiensis as a specific, safe, and effective tool for insect pest control, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **17(4)**, 547 (2007).
6. Kryzhko A. V., Kuznetsova L. N., and Myagkikh E. F., The effect of liquid end volatile extractives of oregano (*Origanum vulgare* L.) on the entomopathogenic bacteria strain *B. thuringiensis* 0371, *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya.*, **7 (1)**, 72 (2017).
7. Gukasyan A. B., The bacteriostatic and bactericidal action of fir-needle and its chemical components on the agent of Siberian moth, *Izvestiya Sibirskogo otdeleniya Akademii nauk SSSR.*, **7**, 174 (1958).
8. Kolchevskii A. G. The impact of plants volatile substances, growing in biocenoses of cabbage and potato fields in the strain *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* 202, *Bull. Institute of agricultural microbiology.*, **33**, 57 (1981).
9. Bugara I. A., Omelchenko A. V., Gazel E. V., and Kirilin K. O., The callus cultures of *Crambe maritima* L. receive and their cytological characteristics, *Uchenye zapiski Krymskogo federalnogo universiteta im V. I. Vernadskogo, seriya-Biologiya, Himiya.*, **70 (2)**, 3 (2018).
10. Murashige T. and Skoog F. A., The revised medium for rapid growth, and bioassays with tobacco tissue culture, *Physiol. Plant.*, **15(13)**, 473 (1962).
11. Kalinin F. L., Sarnackaya V. V. and Polishchuk V. E. *Methods of tissue culture in plant physiology and biochemistry*, 488 p. (Kiev, Naukova Dumka, 1980).
12. Danini E. M. *The basic methodology of the study antibacterial properties of volatile production in higher plants*, 330 p. (Moscow.: Publishing House of the Academy of Medical Sciences of the USSR, 1952).
13. Alexander Steve K., Strete Dennis and Niles Mary Jane, *Laboratory exercises in organismal and molecular microbiology*, 362p. (Boston, McGraw-Hill Science/Engineering/Math 2004).
14. Netrusov A. I., Egorova M. A. and Zakharchuk L. M. *Workshop on Microbiology*, 608 p. (Moscow, Publishing center "Academy", 2005).
15. Khalafyan A. A. *Modern statistical methods in medical research: monograph*, 320 p. (Moscow LEONARD, 2014).

УДК 612.821

ОЦЕНКА ПСИХОФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ СТУДЕНТОВ-СПОРТСМЕНОВ ПО ПОКАЗАТЕЛЯМ КОНЦЕНТРАЦИИ ВНИМАНИЯ И АДАПТАЦИОННОГО ПОТЕНЦИАЛА

*Латюшин Я. В.¹, Петрушкина Н. П.¹, Звягина Е. В.¹, Воровский С. Н.²,
Харина И. Ф.¹*

¹*ФГБОУ ВО «Уральский государственный университет физической культуры», Челябинск, Россия*

²*Медицинская академия имени С. И. Георгиевского (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского», Симферополь, Республика Крым, Россия
E-mail: Dokchel@mail.ru*

В данной статье представлено исследование по изучению взаимосвязи между типом подвижности нервной системы и параметрами внимания студентов-спортсменов. В качестве аргумента актуальности приведены результаты собственных исследований. В изыскании приняли участие 160 студентов Уральского государственного университета физической культуры, средний возраст составил $19 \pm 0,6$ лет. Результаты корректурной пробы – теста Тулуз-Пьерона – явились основой для распределения студентов по точности выполнения. Для оценки психофизиологического состояния из исследуемой выборки были отобраны студенты-спортсмены с высокой ($0,98-1$ усл.ед.) – 42,5 % и слабой ($0,91-0,92$ усл.ед.) 15,6 % точностью внимания. Анализ полученных результатов проводился с применением аппаратного метода по оценке функционального состояния простой зрительно-моторной реакции, а также оценке адаптационного потенциала Р. М. Баевского. У студентов с высокой точностью внимания показатель сенсомоторной реакции составил $189 \pm 16,21$ мс и превалирует удовлетворительный уровень адаптационного потенциала. У студентов со слабой точностью показатель сенсомоторной реакции составил $201 \pm 22,01$ мс и отмечается напряжение функциональных механизмов адаптации.

Ключевые слова: студенты-спортсмены, внимание, адаптационный потенциал, функциональная активность, нервная система.

ВВЕДЕНИЕ

Внимание – важнейшая измеряемая психофизиологическая характеристика высшей нервной деятельности, необходимая в любой сфере человеческой деятельности [1, 2]. Особое значение степень развития внимания имеет в период получения профессионального образования и спортивного совершенствования. Освоение компетенций в условиях сочетанных умственных и физических нагрузок обеспечивает оптимальные количественные и качественные параметры внимания. Учебная и спортивная деятельность предъявляют многогранные требования к индивиду. Это особенности физических качеств во взаимосвязи с психофизиологическим профилем студентов спортсменов. Успешность в учебной и

спортивной деятельности возможна при определенных индивидуально-типологических особенностях личности. Уровень результативности в сочетанных видах деятельности связан с уровнем концентрации внимания. Оптимальное психофизиологическое состояние для студента-спортсмена оценивается диапазоном нейровегетативных показателей, отражающих поведенческие аспекты реагирования на внешние и внутренние стимулы. Поведенческая активность организма в различных условиях, в том числе учебно-тренировочной деятельности обусловлена сформированной функциональной системой. Она обеспечивает сенсомоторное реагирование, являющееся критерием состояния нервной системы (согласованности, синхронности и совпадения ритмов возбуждения в нейронах). Выявление закономерностей психофизиологических показателей с успешностью учебной и спортивной деятельности предусматривает определение и сравнение групп разного уровня спортивной квалификации, либо по частным показателям методики, например, показателя точности внимания, простой зрительно моторной реакции, типа подвижности нервных процессов.

Актуализация данного исследования обусловлена выявлением в 2015–2016 учебном году группы студентов (12 %) в колледже физической культуры Уральского государственного университета физической культуры с признаками синдрома дефицита внимания (СДВ) на основании результатов теста Тулуз-Пьерона [3]. Полученные данные согласуются с исследованиями И. Т. Нуреева, О. В. Поповой и др. о частоте встречаемости среди студентов педагогического вуза г. Кирова синдрома дефицита внимания у 15,7 % (24,0 % – юноши, 12,1 % – девушки) и у 8,8 % студентов медицинского вуза г. Кирова (8,9 % – юноши и 8,7 % – девушки) [4–8].

На следующем этапе (2017–2018 учебном году) было продолжено исследование по выявлению признаков синдрома дефицита внимания у студентов-спортсменов ($n=154$) вуза физической культуры г. Челябинска, в рамках которого установлено, что 7,14 % (9,33 % – юноши, 5,06 % – девушки) имеют патологические (0,9 усл.ед. и ниже) и 6,49 % (юноши – 10,67 %, девушки 2,53 %) слабые (0,91–0,92 усл.ед.) значения концентрации внимания (точность выполнения) по результату теста Тулуз-Пьерона [9–11]. Для уточнения влияния данного особого проявления высшей нервной деятельности у студентов-спортсменов изучалась зависимость исследуемых показателей в образовательной и спортивной деятельности [12, 13].

В образовательной деятельности установлены взаимосвязи параметров внимания и результатов единого государственного экзамена. На группе студентов I–III курса ($n=144$) показано, что удовлетворительные баллы по результату единого государственного экзамена по учебной дисциплине «Биология» ($39 \pm 4,24$ балла) характерны преимущественно для обучающихся со слабой точностью (0,91–0,92 усл.ед.) параметра внимания – 8,33 % (юноши – 15,79 %, девушки – 3,46 %) [12].

В спортивно-тренировочной деятельности ($n=88$), оценивалась связь уровня спортивной квалификации и точность выполнения реализуемой экспресс-методики Тулуз-Пьерона. В результате были получены данные: мастера спорта имеют высокую (50 %) и хорошую точность (50 %), все остальные квалификационные категории (кандидаты в мастера спорта, 1 разряд, 2 разряд, 3 разряд и без разряда) с

разной точностью выполняют предложенную методику. Так, например, среди кандидатов в мастера спорта 43,34 % показывают высокую точность, слабую 10 %, а патологические данные обнаружены у 13,33 % [13]. Открытыми оставались вопросы по изучению типа подвижности нервной системы, адаптационного потенциала у студентов-спортсменов с разным уровнем концентрации внимания.

Вышеизложенное позволило определить перспективу дальнейшего изучения данной темы.

Целью статьи является оценка психофизиологического состояния студентов-спортсменов на основании показателей концентрации внимания, типа подвижности нервной системы, адаптационного потенциала.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование, в котором приняло участие 160 студентов Уральского государственного университета физической культуры, проводилось в рамках учебно-профессиональной деятельности. Средний возраст испытуемых различного уровня спортивной квалификации составил $19 \pm 0,6$ лет. Все студенты были осведомлены о цели исследования, дали добровольное письменное согласие на участие в проекте, который не противоречит этическим принципам, содержащимся в Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (Сеул, 2008).

Сенсомоторное реагирование, уровень устойчивости реакции оценивали по результатам методики «Простая зрительно-моторная реакция (ПЗМР)» (ООО «Нейрософт», Россия) в интерпретации Т. Д. Лоскутовой [14]. Это эргономичный экспресс метод оценки и контроля функционального состояния центральной нервной системы [15]. Выявленный показатель, – устойчивость реакции (УР) – является фактором адаптационных возможностей студента спортсмена, определяющим способность к устойчивой мобилизации ресурсов организма в определенных условиях.

Параметры внимания исследовались с помощью стандартизированного теста Тулуз-Пьерона (в интерпретации Л. А. Ясюковой), который интегрально оценивает внимания как процесс, выявляет степень концентрации, устойчивости, переключаемости, психомоторного темпа, то есть подвижность нервных процессов, точность переработки информации, волевую регуляцию, динамику работоспособности во времени [11]. Особенность данного метода в том, что испытуемый должен в кратчайший период времени оценить условия и принять решение. От скорости и точности данного решения зависит результат выполнения задания. Коэффициент точности (К) выполнения теста Тулуз-Пьерона является основным косвенным показателем для диагностики синдрома дефицита внимания, характеризует уровень развития параметров внимания. Данная методика обладает рядом преимуществ, таких как, независимость от культурной принадлежности, уровня вербального и социального интеллекта обследуемого. Речевые и слуховые дефекты не влияют на его результативность, а результаты тестирования на взрослой выборке стабильны во времени. Сама методика представлена бланком, содержащим десять строчек со «стимульным материалом», которым являются 8 типов

квадратиков, различающихся тем, к «какой грани или к какому из углов добавлены черные полукруг или четверть круга» [11].

Оценку адаптационного потенциала (АП) проводили по формуле Р. М. Баевского [16]:

$$\text{АП} = 0,011 \times \text{ЧП} + 0,014 \times \text{АДс} + 0,008 \times \text{АДд} + 0,014 \times \text{В} + 0,009 \times \text{МТ} - 0,009 \times \text{Р} - 0,27,$$

где АП – адаптационный потенциал; В – возраст, лет, МТ – масса тела, кг; Р – рост, см; АДс – артериальное давление систолическое, мм рт.ст.; АДд – артериальное давление диастолическое, мм рт.ст.; ЧП – частота пульса за 1 мин.

Статистический анализ полученных данных осуществлялся посредством программы Microsoft Office Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В данном исследовании предпринята попытка определить взаимосвязь между точностью выполнения задания и подвижностью нервных процессов у студентов, занимающихся спортивной деятельностью на профессиональной основе в условиях сочетания учебной, спортивно-тренировочной и волонтерской деятельности, по результатам сенсомоторного реагирования. После прохождения теста Тулуз-Пьерона, полученные результаты явились основанием для распределения студентов по точности выполнения задания. В таблице 1 представлены результаты исследования уровня точности внимания по крайним значениям данного параметра в связи с типом подвижности нервных процессов у студентов-спортсменов.

Таблица 1

Распределение показателей точности внимания у студентов-спортсменов (по Л. А. Ясюковой) с разными типами подвижности нервных процессов

Тип подвижности нервных процессов	высокая точность внимания (К) (0,98–1 усл.ед.) (n=68)	слабая точность внимания (К) (0,91–0,92 усл.ед.) (n=25)
инертный	10,3 %(n=7)	72 %(n=18)
промежуточный	44,1 %(n=30)	24 %(n=6)
подвижный	45,6 %(n=31)	4 %(n=1)

Обследование выявило, что у 10,3 % студентов отмечена высокая точность внимания с инертным типом нервной системы, тогда как у 72 % испытуемых выявлены показатели слабой точности выполнения задания. Это может свидетельствовать о развитии утомления, перенапряжении физиологических систем, о десинхронизации течения процессов в организме, что может являться отражением функциональных адаптивных возможностей индивида.

В качестве интегрального показателя использован параметр УР, который отражает устойчивость функционального состояния на непрерывные изменения внешних факторов. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2

**Распределение показателей устойчивости реакции
(УР по Т. Д. Лоскутовой) у студентов-спортсменов с разным уровнем
подвижности нервных процессов**

Точность внимания	Тип подвижности нервных процессов	Уровень реакции		
		Высокий	Средний	Низкий
высокая точность внимания (К) (n=68)	инертный	4,4 % (n=3)	5,8 % (n=4)	–
	промежуточный	26,5 % (n=18)	10,2 % (n=7)	5,8 % (n=4)
	подвижный	38,2 % (n=26)	8,8 % (n=6)	–
слабая точность внимания (К) (n=25)	инертный	8 % (n=2)	36 % (n=9)	40 % (n=10)
	промежуточный	4 % (n=1)	16 % (n=4)	8 % (n=2)
	подвижный	–	–	4 % (n=1)

Независимо от величины показателя были выявлены все уровни функционального состояния центральной нервной системы. Актуальное значение имеет соотношение показателей подвижности нервных процессов и уровня устойчивости реакции. Степень подвижности нервных процессов, их тип, реализуется преимущественно за счет соответствующего уровня устойчивости реакции. Данные показатели интегрально отражают адаптационный резерв и уровень функциональных возможностей студентов.

У студентов-спортсменов с высокой точностью выполнения задания преимущественно выявляется высокий уровень устойчивости реакции, из них с промежуточным типом подвижности нервных процессов 26,5 % и 38,2 % с подвижным. Студенты, выполнившие задания со слабой точностью, преимущественно показывают низкий (40 %) и средний (36 %) уровни устойчивости реакции. Тип подвижности нервных процессов у них определен как инертный. Низкий уровень обусловлен развитием начальных признаков утомления ЦНС, что ведет к увеличению времени сенсомоторного реагирования, снижению концентрации внимания, срыву адаптационных возможностей. При этом усредненные показатели оцениваются как средние, что свидетельствует об оптимальном функциональном уровне системы, нормальной адаптивности.

Высокая устойчивость реакции и подвижный тип нервных процессов определяют высокий уровень функциональных возможностей, что создает благоприятные условия работоспособности в варианте сочетанных нагрузок. Подвижность нервных процессов выступает основным показателем, который наиболее полно отражает способность формировать адекватную заданию

функциональную систему и достаточно долго ее удерживать в данном состоянии. В таблице 3 отражены средние показатели скорости и точности простой зрительно-моторной реакции студентов-спортсменов.

Таблица 3

Результаты исследования скорости (мс) и точности (УР усл.ед) ПЗМР у студентов-спортсменов (по Т. Д. Лоскутовой)

Уровень реакции	Высокая точность (К, усл.ед) (n=68)	Слабая точность (К, усл.ед) (n=25)	Общее (n=160)
ПЗМР, мс	189±16,21	201±22,01	213±26,14
УР усл.ед.	2,09±0,06	2,05±0,08	2,13±0,02
Общее число ошибок	1,7±0,03	2,3±0,04	2±0,01

По полученным данным студенты с высокой точностью и со слабой точностью не имеют статистически значимых отличий в усредненных показателях 189±16,21 и 201±22,01, соответственно. Показатель коэффициента вариации (CV) свидетельствует о том, что в группе студентов с высокой точностью внимания незначительная степень рассеивания CV 7,3 %, тогда как в группе со слабой точностью CV 19,3 % приближается к статистически значимому уровню.

Устойчивость реакции у студентов с высокой точностью нестатистически выше, чем у студентов со слабой точностью и составляют 2,09±0,06 и 2,05±0,08, соответственно. Однако этот показатель ниже среднестатистического, который составил 2,13±0,02. Количество ошибок у испытуемых с высокой точностью достоверно меньше, чем у обследуемых со слабой точностью 1,7±0,03 и 2,3±0,04. Снижение эффективности выполняемой работы при нарастании темпа деятельности, отражает подвижность нервных процессов за счет мобилизации адаптационных механизмов, вызывая их утомление. Необходимость сохранять качества деятельности длительное время требует мобилизации психофизиологических параметров, таких как концентрация внимания, точность, устойчивость реакции. Следовательно, изменение времени ПЗМР в сторону увеличения, а также увеличения количества ошибок при выполнении Тулуз-Пьерона является показательным параметром с учетом точности выполнения и функциональной подвижности.

Интегральным маркером является адаптационный потенциал центральной нервной системы. Это проявляется в снижении качества выполнения простых физиологических и психологических тестов. В таблице 4 представлено распределение результатов исследования у студентов-спортсменов по уровням адаптационного потенциала и точности выполнения теста Тулуз-Пьерона.

У студентов со слабой точностью внимания (59,2 %) обнаружено напряжение функциональных механизмов адаптации к условиям сочетанных нагрузок. Удовлетворительный уровень адаптации выявлен у 85,2 % студентов с высокой точностью и 19,4 % студентов со слабой точностью. Среди студентов со слабой

точностью выполнения задания 21,4 % имеют неудовлетворительный тип и срыв адаптации. Выше обозначенный факт позволяет сделать заключение о высокой «цене» адаптации студентов со слабой точностью, профессионально занимающихся спортом.

Таблица 4

Распределение результатов исследования у студентов-спортсменов с разным показателем точности (тест Тулуз-Пьерона) и по уровню адаптационного потенциала (Р. М. Баевский)

Показатель АП	Студенты с высокой точностью (n=68)	Студенты со слабой точностью (n=25)
Удовлетворительный АП	85,2 % (n=57)	19,4 % (n=5)
Напряжение АП	14,8 % (n=11)	59,2 % (n=15)
Неудовлетворительный АП	–	12,3 % (n=3)
Срыв адаптации	–	9,1 % (n=2)

Анализ результатов данных методов позволяет оценить нейродинамические и индивидуально-типологические характеристики за счет взаимосвязи показателей тестовых методик. Далее велась работа по выявлению корреляционной связи психофизиологических и психологических показателей внимания и подвижности нервных процессов студентов-спортсменов. Статистической обработке были подвергнуты психофизиологические (ПЗМР, мс) и психологические переменные (результаты теста Тулуз-Пьерона, который позволяет оценить свойства внимания – точность (k)). Статистический анализ был направлен на выявления нормального распределения и корреляционного анализа. Результаты исследования нормальности распределения при уровне значимости $p=0,05$ показали, что только показатель «точность» имеет нормальное распределение: Хи-квадрат наблюдаемое (χ^2 набл.) ПЗМР 2,012815; Хи-квадрат критическое (χ^2 кр.) ПЗМР 7,814728. Проведенный корреляционный анализ по Спирмену и Пирсону показал, что между анализируемыми психофизиологическими и психологическими критериями нет статистической связи (коэффициенты корреляции Пирсона r , ранговые коэффициенты Спирмена ρ ПЗМР и k составили 0,11 и 0,10). Интерпретация и анализ данных критериев требует независимой оценки.

В связи с установленными особенностями внимания студентов, профессионально занимающихся спортивной деятельностью в условиях учебно-образовательной и тренировочно-соревновательной деятельности, мы предлагаем придерживаться некоторых рекомендаций. Для обеспечения высокого уровня устойчивости реакции и высокой точности внимания рекомендуем студентам использовать визуализировать и схематизировать словесные инструкции о результатах деятельности, стандартизировать выполнение заданий, минимизировать присутствие раздражителей, соблюдать режимные моменты при выполнении определенной работы с элементами восстановления и профилактики, как умственной, так и физической, использовать методики по развитию мотивационно-волевых качеств.

Преподавателям рекомендуем разработать методические средства формирования положительного динамического стереотипа к образовательной деятельности с учетом индивидуально-типологических особенностей темпов работы студентов в группах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. При оценке психофизиологических особенностей студентов-спортсменов на основании результатов теста Тулуз-Пьерона были определены крайние значения точности внимания: высокая и слабая. По полученным данным методики простой зрительно-моторной реакции студенты-спортсмены распределены по типу подвижности нервных процессов. В зависимости от типа подвижности нервной системы в данной выборке выявлены студенты-спортсмены с разным уровнем устойчивости реакции.
2. При оценке психофизиологического состояния (по методике Р. М. Баевского) у студентов-спортсменов с высокой точностью внимания преобладает удовлетворительный уровень адаптационного потенциала. А у студентов-спортсменов со слабой точностью внимания был определен весь диапазон по показателю адаптационный потенциал.
3. Инертность нервных процессов, низкий уровень устойчивости реакции, слабая точностью внимания предположительно является одним из проявления срыва адаптации и формирования устойчивого состояния дефицита внимания.

Исследование выполнено в рамках научного сотрудничества ФГБОУ ВО «Уральский государственный университет физической культуры», г. Челябинск, Россия и Медицинской академии имени С. И. Георгиевского (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского», г. Симферополь, Республика Крым, Россия.

Список литературы

1. Мачинская Р. И. Управляющие системы мозга / Р. И. Мачинская // Журнал высшей нервной деятельности им. И. П. Павлова. – 2015. – Т. 65, № 1. – С. 33–60. DOI: 10.7868/S0044467715010086
2. Семенова О. А. Влияние функционального состояния регуляторных систем мозга на эффективность произвольной организации когнитивной деятельности у детей. Сообщение II. Нейропсихологический и электроэнцефалографический анализ состояния регуляторных функций мозга у детей предпубертатного возраста с трудностями учебной адаптации / О. А. Семенова, Р. И. Мачинская // Физиология человека. – 2015. – Т. 41, №5. – С. 28–38. DOI: 10.7868/S0131164615050124
3. Звягина Е. В. Интегрированный аспект изучения синдрома дефицита внимания и гиперактивности: анатомо-морфологический и психолого-педагогический ракурс / Е. В. Звягина, И. Ф. Харина // Научно-педагогическое обозрение. – 2016. – № 2 (12). – С. 46–51.
4. Жинжило Е. В. Некоторые критерии диагностики СДВГ и коморбидных проявлений у студентов / Е. В. Жинжило, Н. В. Слепкова, Ю. С. Худина, М. Н. Дмитриев // Архив внутренней медицины. – 2016. – № S1. – С. 106–107.
5. Латышин Я. В. Исследование свойств нервной системы легкоатлетов, специализирующихся в беге на средние дистанции / Я. В. Латышин, Н. В. Хрисанфова // Проблемы современного педагогического образования. – 2017. – № 57-7. – С. 299–305.
6. Нуреев И. Т. Синдром дефицита внимания и гиперактивности у взрослых, его диагностика и влияние на успешность образовательной деятельности студентов (обзор литературы) / И. Т. Нуреев, В. И. Циркин, М. В. Злоказова // Вятский медицинский вестник. – 2012. – № 1. – С. 60–66.

7. Попова О. В. Особенности высших психических функций, электрической активности мозга и успешность обучения подростков и студентов с признаками СДВГ / О. В. Попова, И. Т. Нуреев, С. И. Трухина, Е. Г. Шушканова, А. Н. Трухин, В. И. Циркин, М. В. Злоказова // Вятский медицинский вестник. – 2009. – № 2–4. – С. 77–81.
8. Шепилов А. О. Мониторинг морфофункционального и метаболического состояния юных пловцов / А. О. Шепилов, А. В. Ненашева, А. В. Шевцов, Я. В. Латюшин, И. В. Изаровская // Человек. Спорт. Медицина. – 2018. – Т. 18, № 1. – С. 60–73. DOI: 10.14529/hsm180105
9. Харина И. Ф. Особенности психофизиологических показателей студентов с признаками дефицита внимания в условиях сочетанных умственных и физических нагрузок / И. Ф. Харина, Е. В. Звягина, Е. В. Быков, О. А. Макунина // Вестник Новосибирского государственного педагогического университета. – 2018. – Т. 8, № 3. – С. 181–197. DOI: 10.15293/2226-3365.1803.13
10. Быков Е. В. Организация мониторинга состояния здоровья студентов в Уральском государственном университете физической культуры / Е. В. Быков, О. А. Макунина, О. И. Коломиец, А. Н. Коваленко // Научно-спортивный вестник Урала и Сибири. – 2017. – № 1 (13). – С. 3–9.
11. Ясюкова Л. А. Оптимизация обучения и развития детей с ММД. Диагностика и компенсация минимальных мозговых дисфункций. Методическое руководство / Л. А. Ясюкова – СПб.: ГП «ИМАТОН», 1997. – 80 с.
12. Харина И. Ф. Синергетический подход – условие повышения качества образования студентов – спортсменов / И. Ф. Харина, Е. В. Звягина, Е. В. Быков, О. А. Макунина // Современная высшая школа: инновационный аспект. – 2019. – Т. 11, № 1 (43). – С. 22–30. DOI: 10.7442/2071-9620-2019-11-1-22-30
13. Гришкевич М. С. Изучение концентрации внимания у студентов – спортсменов разного уровня спортивного мастерства / М. С. Гришкевич, И. Ф. Харина // Дневник науки. – 2018. – № 11 (23). – С. 9. https://elibrary.ru/download/elibrary_36528555_77016274.pdf
14. Лоскутова Т. Д. Оценка функционального состояния центральной нервной системы человека по параметрам простой двигательной реакции / Лоскутова Т. Д. // Физиологический журнал СССР им. И. М. Сеченова. – 1975. – Т. 61, № 1. – С. 3–12.
15. Корельская И. Е. Экспресс оценка состояния центральной нервной системы человека по параметрам простой зрительно-моторной реакции / И. Е. Корельская, А. А. Кузнецов // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – № 8 (часть 2) – С. 194–197.
16. Баевский Р. М. Оценка уровня здоровья при исследовании практически здоровых людей / Р. М. Баевский, А. П. Берсенева, Е. С. Лучицкая, И. Н. Слепченкова, А. Г. Черникова. – М., 2009. – 100 с.

EVALUATION OF THE PSYCHOPHYSIOLOGICAL STATE OF STUDENTS-ATHLETES ON INDICATORS OF CONCENTRATION OF ATTENTION AND ADAPTATION POTENTIAL

Latyushin Y. V.¹, Petrushkina N. P.¹, Zvyagina E. V.¹, Vorovsky S. N.², Kharina I. F.¹

¹*Ural State University of Physical Culture, Chelyabinsk, Russia*

²*V. I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Crimea, Russia*

E-mail: dokchel@mail.ru

This article presents a research on the relationship between the type of mobility of the nervous system and the attention parameters of student athletes. As an argument of relevance, the results of our own research are given. In the study 160 students of the Ural State University of Physical Education involved, the average age was 19±0.6 years,

different levels of sports qualifications. The results of the proof test – the Toulouse-Pierre test were the basis for the distribution of students by accuracy of fulfilment. For control the psycho-functional status of the study sample, student athletes were selected with high (0.98–1 conv. units) – 42.5 % and weak (0.91–0.92 conv. units) 15.6 % accuracy attention. The analysis of the results was carried with using the hardware method for assessing the functional state of a simple visual-motor reaction, as well as assessing of the adaptive potential of R. M. Baevsky. 10.3 % of students showed a high accuracy of attention with an inert type of nervous system, and 72 % of the subjects showed indicators of poor accuracy in completing the task. Students-athletes with high accuracy of the assignment predominantly reveal a high level of reaction stability, but of which with an intermediate type of mobility of nervous processes 26.5 % and 38.2 % with motile. Students who completed the tasks with low accuracy mainly show low (40 %) and medium (36 %) levels of reaction stability. In students with high accuracy of attention, the sensorimotor reaction rate was 189 ± 16.21 ms, a satisfactory level of adaptive potential prevailed. In students with poor accuracy of attention, the sensorimotor response was 201 ± 22.01 ms, and in 59.2 %, the voltage of functional adaptation mechanisms was detected. Among students with poor accuracy, 21.4 % have an unsatisfactory type and adaptation failure. The stability of the reaction in students with high accuracy (2.09 ± 0.06) is not statistically higher than in students with low accuracy (2.05 ± 0.08). The number of errors in subjects with high accuracy (1.7 ± 0.03) is significantly less than in subjects with low accuracy (2.3 ± 0.04). A statistical analysis of the physiological and psychological criteria of health of student athletes according to Spearman (0.10) and Pearson (0.11) did not reveal a correlation dependence. In connection with the established features of the attention of students professionally involved in sports, recommendations are proposed for successful implementation in the educational process of the university. Inertia of nervous processes, a low level of stability of the reaction, poor accuracy of attention is supposedly one of the manifestations of the failure of adaptation and the formation of a stable state of attention deficit. The study was carried out in the framework of the project of the state task “Monitoring the health status of students of the Ural State University of Physical Education in Chelyabinsk” for 2016–20 years.

Keywords: student-athletes, attention, adaptive potential, functional activity, nervous system.

References

1. Machinskaya R. I. The Brain Executive Systems, *Journal of Higher Nervous Activity named I.P. Pavlov*, **65** (1), 33. (2015). DOI: 10.7868/S0044467715010086
2. Semenova O. A., Machinskaya R. I. The influence of the functional state of brain regulatory systems on the efficiency of voluntary regulation of cognitive activity in children: II. Neuropsychological and EEG analysis of brain regulatory functions in 10-12-year-old children with learning difficulties, *Human Physiology*, **41** (5), 478 (2015).
3. Zvjagina E. V., Kharina I. F. Integrated aspect of attention deficit disorder and hyperactivity study: anatomic-morphological and psychological angles, *Academic (educational research) review. (Pedagogical Review)*, **2** (12), 46 (2016).
4. Zhinzilo E. V., Slepikova N. V., Khudina Yu. S. and Dmitriev M. N. Some criteria of students' attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) and comorbid signs diagnostics, *Archives Of Internal Medicine*, **S1**, 106 (2016).

5. Latyushin Yu. V., Khrisanfova N. V. This article gives the characteristic of the properties of the nervous system of athletes, specializing of the run to average distances, *Problems of modern pedagogical education*, **57** (7), 299 (2017).
6. Nureev I. T., Tzirkin V. I., Zlokazova M. V. Attention deficit syndrome of adults: its diagnostics and impact over students' educational activity successfulness (literature review), *Medical Newsletter of Vyatka*, **1**, 60 (2012).
7. Popova O. V., Nureev I. T., Trukhina S. I., Shushkanova E. G., Trukhin A. N., Tzirkin V. I. and Zlokazova M. V. Higher mental functions peculiarities, electrical brain activity and studying successfulness of adolescents and students, having signs of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD), *Medical Newsletter of Vyatka*, **2-4**, 77 (2009).
8. Shepilov A. O., Nenasheva A. V., Shevtsov A. V., Latyushin Yu. V. and Izarovskaia I. V. Control of morphofunctional and metabolic state in young swimmers, *Human. Sport. Medicine*, **18** (1), 60 (2018). DOI: 10.14529/hsm180105
9. Kharina I. F., Zvjagina E. V., Bykov E. V. and Makunina O. A. Psychophysiological characteristics of students with the symptoms of attention deficit disorder under the conditions of combined mental and physical loads, *Novosibirsk State Pedagogical University Bulletin*, **8** (3), 181 (2018). DOI: 10.15293/2226-3365.1803.13
10. Bykov E. V., Makunina O. A., Kolomiets O. I. and Kovalenko A. N. Students' health state monitoring organisation at the Ural State University of Physical Culture, *Scientific and sport bulletin of Ural and Siberia*, **1** (13), 3 (2017).
11. YAsyukova L. A. *Optimizing learning and development of children with MMD. Diagnosis and compensation of minor cerebral dysfunction*. Methodical guidance (St. Petersburg, GP "IMATON" Publ.), 80 p. (1997).
12. Kharina I. F., Zvjagina E. V., Bykov E. V. and Makunina O. A. Synergetic approach – a condition for improving the quality of education of students athletes, *Contemporary Higher Education: Innovative Aspects*, **11** (1), 22 (2019). DOI: 10.7442/2071-9620-2019-11-1-22-30
13. Grishkevich M. S., Kharina I. F. Studying the concentration of the attention of the students-sportsmen of different level of sports mastery, *Science diary*, **11** (23), 9 (2018). https://elibrary.ru/download/elibrary_36528555_77016274.pdf
14. Loskutova T. D. Parameters of the reaction time as criteria of the functional state of the human brain (russian), *Physiological journal of the USSR. of I. M. Sechenov*, **61** (1), 3 (1975).
15. Korelskaya I. E., Kuznetsov A. A. Evaluation of the central nervous system in human parameters of simple visual-motor response, *International journal of applied and fundamental research*, **8** (2), 194 (2016).
16. Baevsky R. M., Berseneva A. P., Luchitskaya E. S., Slepchenkova I. N. and Chernikova A. G. *Health level evaluation during apparently healthy people examination*, 100 p. (M., 2009).

УДК 612.014.43

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ КРОВИ И ТКАНЕВОЙ МЕТАБОЛИЗМ ПРИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПРОБАХ У ВЕЛОСИПЕДИСТОВ ВМХ

Литвин Ф. Б.

*Смоленская государственная академия физической культуры, спорта и туризма, Смоленск,
Россия
E-mail: bf-litvin@yandex.ru*

В работе показаны возможности применения метода лазерной доплеровской флоуметрии для оценки состояния системы микроциркуляции кожных покровов в верхних конечностях 14 высококвалифицированных спортсменов велосипедистов ВМХ. Состояние микрокровотока и уровень метаболизма оценивали при проведении локальных температурных проб с разным температурным режимом. Для оценки адаптивных изменений применялся вейвлет-анализ сигнала, регистрируемого методом лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ)-грамм. Уровень метаболизма оценивали способом флуоресцентной спектроскопии по оценке активности тканевых коферментов: восстановленного НАДН и окисленного кофермента ФАД. По результатам тепловой и холодовой проб выявлен разный уровень функционального резерва микроциркуляторного русла, состояние адаптационных механизмов, а также изменения концентрации коферментов.

Ключевые слова: микроциркуляция, спортсмены, лазерная доплеровская флоуметрия, температурная проба, коферменты.

ВВЕДЕНИЕ

В современном спорте достижение рекордных показателей зависит от адекватного запросам рабочих органов, обеспечения клеток пластическим и энергетическим материалом [1]. Непосредственным исполнителем по доставке этих ресурсов выступает микроциркуляторное русло. Система микроциркуляции обладает изменчивостью динамических характеристик и создает условия для адаптации кровотока к внешним нагрузкам [2]. Изучение показателей микроциркуляции имеет важное прикладное значение для спортивной физиологии. В частности, при соревновательной деятельности в различных температурных природно-климатических условиях. Для оценки функционального состояния организма и уровня его работоспособности в зависимости от температурного фона среды, перспективным диагностическим инструментом выступает тепловая и холодовая пробы. Исследованиями последних лет [3, 4] были выявлены функциональные изменения нутритивного кровотока, особенности механизмов регуляции в зависимости от величины локальной температуры. Открытым остается вопрос биоэнергетического обеспечения клеточного метаболизма. Возможность витального изучения работы ферментных систем клеточного метаболизма появилась с

использованием флуоресцентной спектроскопии для характеристики флуоресценции восстановленных никотинамидадениндинуклеотидов (НАДН) и окисленных флавопротеидов (ФП) в видимой области спектра [5]. Активность ферментов зависит от многих факторов, среди которых первостепенное значение имеет температура среды. Повышение температуры в интервале 0–50 °С обычно приводит к плавному увеличению ферментативной активности, что связано с ускорением процессов формирования фермент-субстратного комплекса и всех последующих событий катализа. При повышении температуры на каждые 10 °С скорость реакции увеличивается примерно вдвое (правило Вант-Гоффа) [6]. Окислительный метаболизм зависит от того в окисленной или восстановленной форме находятся коферменты НАДН, НАД⁺, НАДФН, ФАД⁺, ФАДН₂ участвующие в окислительно-восстановительных реакциях [7–9]. Следовательно, соотношение окисленных и восстановленных форм окислительного метаболизма определяется функциональной активностью клетки. Количественные флуориметрические показатели весьма информативны для интегральной оценки функционального состояния организма [5].

В связи с этим целью исследования явилось изучение функциональных изменений и уровня метаболизма при температурных пробах у велосипедистов ВМХ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследованиях приняло участие 14 велосипедистов ВМХ от 1 разряда до МС на базе СДЮШОР Брянской области. Все участники экспериментальных исследований были ознакомлены с содержанием исследования и подписали форму информированного согласия с указанием их готовности к участию в работе. Исследование гемодинамических и метаболических параметров осуществлялось с использованием ЛДФ – канала и флуоресцентной спектроскопии комплекса «ЛАЗМА МЦ» (ООО НПП «ЛАЗМА», г. Москва). Тепловую и холодную пробы проводили при помощи аппарата «ЛАЗМА-ТЕСТ» ((ООО НПП «ЛАЗМА», г. Москва). В процессе исследований оптический зонд устанавливали на вентральной поверхности 4 пальца правой кисти. Для частотного анализа различных механизмов регуляции: пассивных, формирующихся вне микроциркуляторного русла и попадающих в микрососуды извне с током крови, и активных, образующихся в микроциркуляторном русле и отражающих динамические изменения тонус-формирующих механизмов, применялась программа LDF3.0.2.384 (ООО НПП «ЛАЗМА»). Программа реализует непрерывное вейвлет-преобразование с использованием в качестве анализирующего вейвлета комплекснозначный вейвлет Морле [10, 11]. Каждое исследование состояло из 4 этапов: базовый тест в течение 8 мин, охлаждение до 10 °С – 1 мин и локальные тепловые пробы 35 °С и 40 °С по 4 мин каждая. Таким образом, общая длительность измерения составляла 17 минут. Все исследования проводились в положении сидя в условиях физического и психологического покоя с адаптацией испытуемых к температуре помещения 20–24 °С в течение 10 минут. В качестве параметров, анализируемых методом ЛДФ, регистрировали неосцилляторные показатели базального кровотока: показатель перфузии (ПМ, пф. ед.), среднее квадратичное отклонение (флакс, СКО, пф. ед.), коэффициент вариации (Kv, %). С помощью вейвлет-анализа ЛДФ-сигнала

определяли амплитуды колебаний кровотока разных частотных диапазонов. Наиболее низкая частота (0,0095–0,02 Гц) характерна для эндотелиальных колебаний, обусловленных периодическими сокращениями эндотелиоцитов. Эндотелиальные колебания отражают воздействие гуморально-метаболических факторов на микрососудистое русло и характеризуют состояние нутритивного кровотока [12]. Колебания в частотах 0,07–0,15 Гц, или миогенные колебания, обусловлены периодической активностью гладкомышечных волокон артериол, приводящих к изменению диаметра их просвета (вазомоции) [13]. На такую периодичность констрикции и дилатации микрососудов накладываются нейрогенные колебания (0,02–0,046 Гц), отражающие симпатическую регуляторную активность [14]. К высокочастотным колебаниям относятся дыхательные (0,15–0,4 Гц) и пульсовые (0,8–0,16 Гц). Дыхательные волны представлены периодическими изменениями давления в венозном отделе сосудистого русла, вызываемыми дыхательными экскурсиями грудной клетки [14]. Пульсовые колебания кровотока обусловлены перепадами внутрисосудистого давления, которые в большей или меньшей степени синхронизированы с кардиоритмом [10]. Методом флуоресцентной спектроскопии оценивали спектральную мощность тканевых коферментов: восстановленного никотинамидадениндинуклеотида (НАДН) и окисленного флавинадениндинуклеотида (ФАД). Проводился статистический анализ полученных данных. Для сравнения переменных использовался непараметрический критерий Т Вилкоксона. Различия считались достоверными при значении $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При анализе полученных данных с первоначальным кратковременным (1 минута) понижением температуры в области зондирования микрокровотока и последующим ее повышением было выявлено разнонаправленные изменения гемодинамических показателей микроциркуляторного русла кожи. Понижение температуры до 10 °С сопровождается снижением перфузии на 25 % и показателя флакса – на 54 % (таблица 1).

Снижение величины флакса обычно свидетельствует об угнетении активных вазомоторных механизмов модуляции тканевого кровотока или преобладании в регуляции тонических симпатических влияний [15]. Кратковременное воздействие низкой температуры не позволяло регистрировать эндотелиальные колебания. Среди активных механизмов отмечается достоверное снижение на 35 % амплитуды нейрогенных и на 37 % миогенных осцилляций ($p < 0,05$). Следовательно, кратковременное холодное раздражение терморецепторов вызывает мощную вазоконстрикторную реакцию миоцитов в стенке мелких артериол и гладкомышечных клеток прекапиллярных сфинктеров. Среди пассивных механизмов при охлаждении до 10 °С существенных изменений не наблюдается. Снижение притока крови в обменное звено микроциркуляторного русла, по всей видимости, ограничивает поступление энергетического субстрата (глюкоза) и кислорода в клетку, кратковременно замедляя реакции с участием коферментов. В результате снижается активность НАДН в дыхательной цепи митохондрий на уровне комплекса I. По сравнению с базовым уровнем содержание НАДН

повышается на 16 %. Одновременно на 10 % повышается содержание окисленной формы ФАД. Показатель соотношения ФАД/НАДН снижается на 6 %, видимо замедляются и реакции окислительного фосфорилирования, поскольку, как отмечает Карнаухов [6], если соотношение ФАД/НАДН увеличивается, то состояние митохондрии расценивается как активное. Это сопровождается высоким содержанием АДФ, высоким содержанием субстрата и интенсивным дыханием.

Таблица 1

Динамика гемодинамических показателей и уровня метаболизма в системе микроциркуляции при температурных пробах ($M \pm m$)

Показатель	1 этап базовый тест 25 °С	2 этап охлаждение до 10 °С	3 этап нагревание до 35 °С	4 этап нагревание до 40 °С
	8 мин	1 мин	4 мин	4 мин
ПМ, пф. ед.	6,90±2,30	5,53±2,41	9,44±3,08	20,06±5,11*
σ, пф. ед.	1,37±0,26	0,89±0,15	2,03±0,38	1,57±0,43
Kv, усл. ед.	20,10±2,80	15,81±1,72	20,58±2,15	8,51±0,96*
НАДН	0,76±0,06	0,87±0,09	0,65±0,05	0,58±0,04*
ФАД	0,40±0,03	0,44±0,03	0,34±0,02*	0,31±0,02*
ФАД/НАДН	0,53±0,08	0,50±0,08	0,54±0,10	0,55±0,09
Аэ, пф. ед.	14,95±1,40	–	16,79±1,61	11,12±1,02*
Ан, пф. ед.	16,74±1,51	12,41±1,05*	18,60±1,75	15,66±1,53
Ам, пф. ед.	14,06±1,38	10,24±0,92*	19,63±2,08*	20,81±2,00*
Ад, пф. ед.	11,53±1,09	11,71±1,14	14,39±1,22*	16,18±0,35*
Ас, пф. ед.	5,50±0,28	5,61±0,32	6,73±0,44*	7,49±0,49*

Примечание: * различия по отношению к показателю базового теста (25 °С) < 0,05

Следовательно, в клетках снижается интенсивность окислительно-восстановительных процессов. При нагревании ткани до 35 °С увеличивается приток крови в микроциркуляторное русло с ростом величины ПМ на 37 %, при высокой сохранности активных механизмов модуляции кровотока о чем свидетельствует рост на 48 % показателя флакса. На усилении активных механизмов регуляции указывает и стремительное повышение на 30 % величины показателя Kv при температуре 35 °С по сравнению с показателем при локальном охлаждении. Величина Kv восстанавливается до базового значения (20,58±2,15 %). Повышение температуры вызывает перегруппировку осцилляций, направленных на вазодилатацию сосудов. В результате показатель эндотелий-зависимой вазодилатации повышается на 12 %, гладкомышечных клеток артериол (нейрогенные осцилляции) на 11 %, клеток прекапиллярных сфинктеров (миогенные осцилляции) на 40 %. Повышение температуры сопровождается достоверным ростом на 22 % вклада сердечных сокращений в приток крови в артериальное звено и на 25 % дыхательных колебаний на отток крови из венозного отдела микроциркуляторного русла ($p < 0,05$). При нагревании до 35 °С

активизируется утилизация субстрата с активизацией работы коферментов. Этому способствует усиление нутритивного кровотока, с одновременным повышением диффузии кислорода из крови в ткани [16]. Активизируется реакция окисления НАДН, в результате его содержание снижается на 17 %, при этом восстанавливается окисленная форма кофермента ФАД с понижением концентрации на 18 %. На синхронную цикличность изменений активности коферментов в восстановленной и окисленной формах указывает ряд авторов [17]. Проведение тепловой пробы с повышением локальной температуры до 40°C выводит показатель ПМ на максимальную величину ($20,06 \pm 5,11$ пф. ед.). Формируется гиперемический тип микроциркуляции и изменяется приоритетность в работе регуляторных механизмов. В частности, снижается показатель эндотелий-зависимой вазодилатации в основе которого может лежать ослабление синтеза оксида азота при усилении продукции вазоконстрикторов, например эндотелина-1. Незначительно повышается тонус артериол, направленный на ограничение притока крови в систему микроциркуляции. Для улучшения оттока крови и устранения застойных явлений усиливается пропускная способность прекапиллярных артериол и метартериол с увеличением Ам на 48 % ($p < 0,05$). Одновременно на 40 % ($p < 0,05$) повышается амплитуда дыхательного ритма, что свидетельствует о повышении их значимости в оттоке крови из веноулярного звена. В работе [8] установлены положительные корреляционные связи между дыхательной модуляцией и величиной кровотока, причем теснота этой связи усиливается по мере развития гиперемии. С повышением температуры до 40 °С по сравнению с базовой температурой продолжает синхронно снижаться на 31 % уровень восстановленного кофермента НАДН и на 29 % окисленного ФАД. Энергетическая активность клеток по соотношению ФАД/НАДН тенденциозно повышается.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. При проведении холодовой пробы с понижением температуры до 10 °С снижается интенсивность микроциркуляции и уровень колеблемости эритроцитов. Изменяется баланс сосудистых механизмов регуляции с усилением тонуса нейрогенного и миогенного ритмов. Активность внесосудистых механизмов практически не изменяется. Снижается активность коферментов окислительного метаболизма.
2. Ступенчато нарастающее воздействие температуры приводит к формированию гиперемического типа микроциркуляции, который обеспечивается синхронной работой активных и пассивных механизмов регуляции микрокровотока. Отмечается максимально высокая активность восстановленной формы кофермента НАДН и окисленной ФАД.
3. Выявленные функциональные изменения микроциркуляторного русла и клеточного метаболизма при разных температурных режимах могут быть использованы при проведении тренировочных и соревновательных физических нагрузок у спортсменов в разных климато-географических условиях окружающей среды.

Список литературы

1. Очерки спортивной фармакологии. Том 4. Векторы энергообеспечения / под редакцией Н. Н. Каркищенко и В. В. Уйба. – М., СПб.: «Айсинг», 2014. – 296 с.
2. Pries A. R. Physiological basis of the microcirculation: vascular adaptation / A. R. Pries // *Klin. Monbl. Augenheilkd.* – 2015. – Vol. 232, № 2. – P. 127.
3. Филина М. А. Функциональные изменения микроциркуляции крови в коже стопы при тепловых пробах у пациентов с сахарным диабетом / М. А. Филина, В. Е. Потапова, И. Н. Маковик и др. // *Физиология человека.* – 2017. – Т.4, №6. – С. 95–102.
4. Крупаткин А. И. Пульсовые и дыхательные осцилляции кровотока в микроциркуляторном русле кожи человека / А. И. Крупаткин // *Физиология человека.* – 2008. – Т.34, №3. – С. 70–76.
5. Самойлов В. О. Флуоресценция компонентов дыхательной цепи митохондрий в медицинской диагностике / В. О. Самойлов // *Биофизика.* – 2013. – Т.58, вып.5. – С. 813–818.
6. Карнаухов В. Н. Люминесцентный анализ клеток / В. Н. Карнаухов – Пущино, 2002. – 131 с.
7. Bilan D. Genetically encoded fluorescent indicator for NAD⁺/NADH ratio imaging in different cellular compartments. / D. Bilan, M. Matlashov, A. Gorokhovatsky, et. al. // «Mechanisms in Biology», The 38th FEBS Congress, 2013, St. Petersburg, Russia.
8. Green D. R. Mitochondria and apoptosis / D. R. Green, J. C. Reed // *Science.* – 1998. – Vol. 281. – P. 1309–1312.
9. Ziegler M. New functions of a long-known molecule. Emerging roles of NAD in cellular signaling / Ziegler M. // *Eur. J. Biochem.* – 2000. – Vol. 267. – P. 1550–1564.
10. Stefanovska A. Wavelet analysis of oscillations in the peripheral blood circulation measured by laser Doppler technique / A. Stefanovska, M. Bracic, H. D. Kvernmo // *IEEE Trans.Biomed. Eng.* – 1999. – Vol. 46, № 10. – P. 1230.
11. Tankanag A. V. A method of adaptive wavelet filtering of the peripheral blood flow oscillations under stationary and non-stationary conditions / A. V. Tankanag, N. K. Chemeris // *Phys. Med. Biol.* – 2009. – Vol. 54, № 19. – P. 5935.
12. Крупаткин А. И. Колебания кровотока частотой около 0.1 Гц в микрососудах кожи не отражают симпатическую регуляцию их тонуса / Крупаткин А. И. // *Физиология человека.* – 2009. – Т. 35, № 2. – С. 60.
13. Mück-Weymann M. E. Respiratory-dependent laser-Doppler flow motion in different skin areas and its meaning to autonomic nervous control of the vessels of the skin / Mück-Weymann M. E., Albrecht H. P., Hage D. et al. // *Microvasc. Res.* – 1996. – Vol. 52, № 1. – P. 69.
14. Söderström T. Involvement of sympathetic nerve activity in skin blood flow oscillations in humans / Söderström T., Stefanovska A., Veber M., Svensson H. // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2003. – Vol. 284, № 5. – P. 1638.
15. Козлов В. И. Развитие системы микроциркуляции / В. И. Козлов – М.: РУДН, 2012. – 314 с.
16. Литвин Ф. Б. Влияние апипродукта "Билар" на транспорт кислорода в системе микроциркуляции у юных лыжников-гонщиков / Ф. Б. Литвин, С. С. Голощапова, О. С. Журавков // *Тромбоз, гемостаз и реология.* – 2016. – №3, Приложение 1. – С. 252–253.
17. Трибрат Н. С. Динамика показателей окислительного метаболизма при воздействии низкоинтенсивного электромагнитного излучения миллиметрового диапазона / Н. С. Трибрат, Э. Р. Джелдубаева, Е. Н. Чуян, А. Г. Трибрат // *Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского. Биология. Химия.* – 2019. – Т.5, №3. – С. 122–130.

FUNCTIONAL CHANGES IN THE BLOOD MICRO-CIRCULATION AND INTERSTITIAL METABOLISM AMONG THE BMX CYCLISTS' FUNCTIONAL ANALYSIS

Litvin F. B.

*Smolensk State Academy of Physical Culture, Sports and Tourism, Smolensk, Russia
E-mail: bf-litvin@yandex.ru*

Research of hemodynamic and metabolic parameters has occurred through the use of LDF-method and fluorescent spectroscopy of "LAZMA MC" complex (SPE "LAZMA" Ltd, Moscow). Heat and cold tests have been conducting with the "LAZMA-TEST" apparatus (SPE "LAZMA" Ltd, Moscow). Each research has involved 4 stages: baseline test for 8 minutes, cooling to a 10 degrees in 1 minute and the local thermal tests at 35 and 40 degrees for 4 minutes each. Thus, the overall duration of the measurement is 17 minutes. Spectral power flow of cofactors (reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) and oxidized flavin adenine dinucleotide (FAD)) were evaluated by the fluorescent spectroscopy method. Static analysis of the data received was conducted. Non-parametric Wilcoxon signed-rank test was used for that variable. Differences were considered as credible at value $p < 0,05$. Based on cold test at 10 degrees there's a 25 % decreased perfusion and 54 % decreased performance of flax. Active work of vasomotor system of modulation of blood flow is being commandeered. Amplitude of neurogenic oscillation is reduced by 35 %, and amplitude of myogenic oscillation is reduced by 37 % ($p < 0,05$). Reactions of oxidation metabolism are slowing down. A reduced NAD content has increased by 16 % comparing to baseline performance, and oxidized FAD – by 10 %. Increasing the temperature to 35 degrees and then to 40 degrees causes the blood flow to micro-circulation to a shift to hyperaemic type of micro-circulation. Vasodilation effect is formed by reducing the tone of endotheliocytus, arterioles, metarterioles and precapillary sphincters. Increase of reaction's activity of NAD oxidation and of the FAD reduction are accompanied with statistically robust increase of their concentration compare to baseline performance. In general terms the results of the heat and cold tests revealed a different levels of functional reserve of micro-circulation, of status of adaption mechanisms as well as the changes in concentration of coenzymes.

Keywords: micro-circulation, sportsmen, laser Doppler flowmetry, heating test, coenzymes.

References

1. Essays of the sports pharmacology. Volume 4. Extrapolation vectors, edited by Karkischenko N. N. and Uiba V. V., 296 p. (SPb.: «Icing», 2014).
2. Pries A. R. Physiological basis of the microcirculation: vascular adaptation, *Klin. Monbl. Augenheikd.*, **232**, 2, 127 (2015).
3. Filina M. A. Potapova E. V., Makovik I. N., Zharkih E. V., Dremmin V. V., Zharebtsov E. A., Dunaev A. V., Sidorov V. V., Krupatkin A. I., Alimicheva E. A., Masalygina G. I., Muradyan V. F., Functional Changes of Blood Microcirculation in the Skin of the Foot during Heating Tests in Patienys with Diabetes, *Human Physiology*, **4**, 6, 95 (2017).

4. Krupatkin A. I. Cardiac and respiratory oscillations of the blood flow in microvessels of the human skin, *Human Physiology*, **34**, **3**, 323 (2008)
5. Samoilov V. O. Fluorescence of mitochondrial respiration chain components in medical diagnostics, *Biophysics*, **58**, **5**, 640 (2013).
6. Karnaukhov V. N. *Luminescent cell analysis*, 131 p. (Puschino, 2002).
7. Bilan D., Matlashov M., Gorokhovatsky A., et.al. *Genetically encoded fluorescent indicator for NAD⁺/NADH ratio imaging in different cellular compartments*, «Mechanisms in Biology», The 38th FEBS Congress, (St. Petersburg, Russia. 2013).
8. Green D. R., Reed J. C. Mitochondria and apoptosis, *Science*, **281**, 1309. (1998)
9. Ziegler M. New functions of a long-known molecule. Emerging roles of NAD in cellular signaling, *Eur. J. Biochem.*, **267**, 1550 (2000).
10. Stefanovska A., Bracic M., Kvernmo H. D. Wavelet analysis of oscillations in the peripheral blood circulation measured by laser Doppler technique, *IEEE Trans.Biomed. Eng.*, **46**, **10**, 1230 (1999).
11. Tankanag A. V., Chemeris N. K. A method of adaptive wavelet filtering of the peripheral blood flow oscillations under stationary and non-stationary conditions, *Phys. Med. Biol.*, **54**, **19**, 5935 (2009).
12. Krupatkin A. I. Blood flow oscillations at a frequency of about 0.1 Hz in skin microvessels do not reflect the sympathetic regulation of their tone, *Human Physiology*, **35**, **2**, 183 (2009).
13. Mück-Weymann M. E., Albrecht H. P., Hage D. et al. Respiratory-dependent laser-Doppler flux motion in different skin areas and its meaning to autonomic nervous control of the vessels of the skin, *Microvasc. Res.*, **52**, **1**, 69 (1996).
14. Söderström T., Stefanovska A., Veber M., Svensson H. Involvement of sympathetic nerve activity in skin blood flow oscillations in humans, *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, **284**, **5**, 1638 (2003).
15. Kozlov V. I. *The development of the microcirculation system*, 314 p. (RUDN, 2012).
16. Litvin F. B., Goloshapova S. S., Zhuravkov O. S. Effect of apiprodukt "Bilar" on oxygen transport in microcirculation at young cross-country skiers, *Thrombosis, hemostasis and rheology*, **3**, **1**, 252 (2016).
17. Tribat N. S., Dzheldubayeva E. I., Chuyan E. N., Tribat A. G. Trends in the indicators for oxidizing metabolism against the low intensity electromagnetic radiation of the millimeter range, *Scientific notes of the Crimean Federal University named after V. I. Vernadsky. Biology. Chemistry*, **5**, **3**, 122 (2019).

УДК 612.172/.176.4-073.97

**ВЫЯВЛЕНИЕ ВОЗРАСТНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ АКТИВАЦИИ
САНОГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ У ШКОЛЬНИКОВ С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФАКТОРНОГО АНАЛИЗА И МАТЕМАТИЧЕСКОГО
МОДЕЛИРОВАНИЯ**

Минина Е. Н., Богач И. Н.

*Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», Симферополь, Республика Крым, Россия
E-mail: cere-el@yandex.ru*

В школьном возрасте на здоровье учащихся на фоне физиологических возрастных особенностей оказывает значительное влияние сам процесс образования и средовые факторы. В оценке роли образовательной среды в жизни детей наблюдается однобокость, ее влияние рассматривается только как фактор риска для здоровья учащихся, с возможным переходом на уровень фактора патогенетического. Использование факторного анализа (метода главных компонент) и математического моделирования (алгебраической модели конструктивной логики) позволило изучить характер функциональных взаимоотношений частей целостного организма и выявить возрастные особенности саногенеза в процессе роста и развития в образовательной среде. Выявлено, что наиболее важные системообразующие показатели функционального состояния кардиореспираторной системы у школьников разных возрастов различны, а на фоне образовательной среды формируют специфические дисфункциональные состояния. Математические алгоритмы позволили выявить возрастные маркеры возникновения риска дисфункциональных состояний, на основании которых была разработана схема принятия решений при их использовании в оценке уровня функционального состояния и направленности коррекционных мероприятий.

Ключевые слова: саногенез, математическое моделирование, факторный анализ, возрастные особенности.

ВВЕДЕНИЕ

В процессе роста и развития организма ребёнка формирующийся запас резервных возможностей обеспечивает надежность и целесообразность в работе любой биологической системы. Именно надежность функционирования биологических систем она отражает высокий приспособительный эффект развития организма на каждом этапе онтогенеза и является одним из общих принципов индивидуального развития [1, 2]. При этом гетерохронное созревание различных функциональных систем в разные сроки постнатальной жизни в зависимости от их значимости обеспечивают жизненно-важных функций оптимальное приспособление организма к условиям существования [1–3].

В школьном возрасте на здоровье учащихся на фоне физиологических возрастных изменений оказывает значительное влияние сам процесс образования и

средовые факторы. Причем «состояние среды жизнедеятельности современных российских школьников является неблагоприятным для нормального роста, развития и здоровья учащихся» [4].

В оценке роли образовательной среды в жизни детей наблюдается некоторая однобокость и её влияние рассматривается только как фактор риска для здоровья учащихся, с возможным переходом на уровень патогенетического фактора [5, 6]. При этом на фоне действия патогенетических факторов, в том числе индуцированных влиянием образовательной среды, происходит активация саногенетических факторов, обеспечивающих продуктивное взаимодействие организма ребенка со средой и восстанавливающих нарушенное равновесие в организме [7] (Рис. 1).

В этом случае нарушения гомеостаза организма в группах условно здоровых учащихся, что находит свое отражение в изменениях показателей функциональной активности различных органов и систем организма, мало изучены, а маркеры возникновения рисков и ранних проявлений дизадаптации, с учётом возрастных особенностей школьников, недостаточно отражены в литературе. Однако отмечается, что учебная деятельность обучающихся школьников в 1, 5, 9 и 11 классах отличается наибольшей стрессовой составляющей, по причине смены социальных требований и сложности выполняемых учебных заданий.

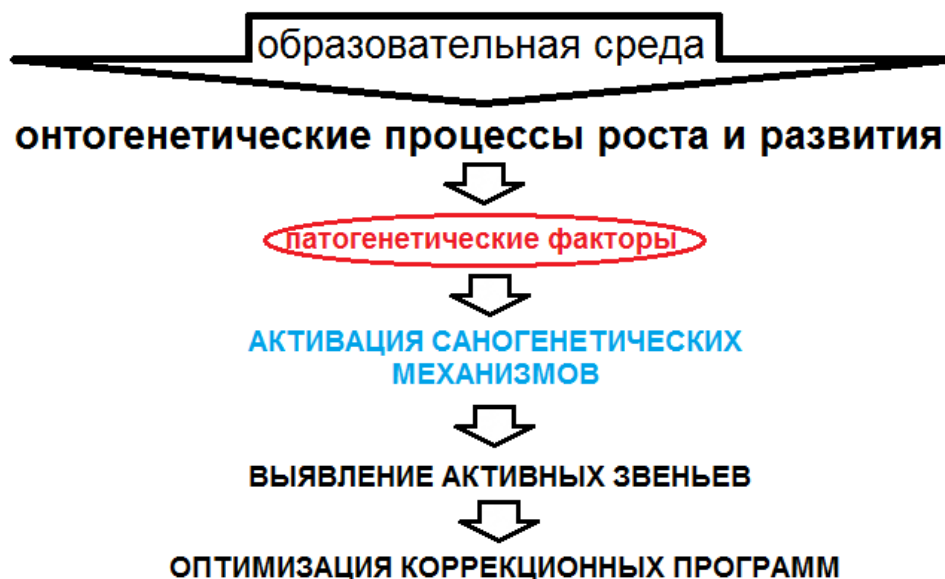


Рис. 1. Схема влияния факторов на организм ребёнка в условиях образовательной среды

Статистический анализ помогает понять структуру многомерного массива полученных данных, провести их классификацию, выявить взаимосвязи [2, 8], что позволяет определить стратегию принятия решения при выборе оптимальной

коррекционной программы и составлении адекватного комплекса физической реабилитации.

Использование математических алгоритмов в анализе параметров кардиореспираторной системы, позволит изучить характер функциональных взаимоотношений частей целостного организма и особенности формирования их взаимосвязей в процессе роста и развития в условиях образовательной среды и решать разноплановые задачи в оценке, ранжировании и коррекции уровня здоровья школьников при реализации здоровьесберегающих технологий.

В связи с вышесказанным, **целью** исследования явилось выявление возрастных маркеров активации саногенетических механизмов у школьников в периодах, наиболее подверженных стрессовому влиянию, и разработку схемы принятия решений в оценке уровня функционального состояния кардиореспираторной системы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Регистрацию и анализ ЭКГ в фазовом пространстве с определением параметров фазовой графической иллюстрации (ФГИ), фазового усреднённого кардиоцикла (ФУК) и variability сердечного ритма проводили с помощью программно-технического комплекса «ФАЗАГРАФ®» [9–14], в котором реализована оригинальная информационная технология обработки электрокардиосигнала в фазовом пространстве с использованием идей когнитивной компьютерной графики и методов автоматического распознавания образов (МНУЦИТИС НАН и МОН Украины). Анализировали следующие показатели ритма сердца: индекс напряжения Баевского (ИН, усл. ед), моду (M_0 , мс), амплитуду моды (AM_0 , %), SDNN — стандартное отклонение N–N— интервалов; SDANN — стандартное отклонение средних значений SDNN из 5 (10)-минутных сегментов, RMSSD — квадратный корень из суммы квадратов разности величин последовательных пар N–N-интервалов, NN50 — количество пар последовательных N–N-интервалов за весь период записи, различающихся более чем на 50 мс.; спектральные показатели сердечного ритма: высокочастотная компонента (HF, %), медленные волны 1-го порядка (LF, %), медленные волны (VLF, %), коэффициент вагосимпатического баланса рассчитывали по формуле LF/HF (усл. ед.),

Для оценки структуры ЭКГ-сигнала при различных условиях с использованием ФГИ, полученной в результате преобразования ЭКГ-сигнала в фазовой плоскости, изучали следующие параметры:

- параметр симметрии фрагмента реполяризации усредненной фазовой траектории (βT , ед.) и выборочную дисперсию симметрии зубца Т ($d\beta T$, ед.), которую рассчитывали автоматически по формуле

$$D = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}.$$

- параметр рассеивания точек фазовых траекторий (σ_{QRS} , ед.)
- угол ориентации усредненной фазовой траектории (α_{QRS} , град.)

- показатель отношения площадей петель зубца Т и комплекса QRS усредненной фазовой траектории (STR, ед.)

Параметры фазовой графической иллюстрации: симметрия участка фазовой графической иллюстрации, соответствующей зубцу Т одноканальной ЭКГ (βT , ед.), рассчитывалась автоматически по отношению D2/D1; показатель отношения площадей петли Т и петли QRS (STR, ед.) рассчитывали методом планиметрического измерения площади. Анализировали параметры ФУК: продолжительность амплитудные характеристики зубцов Р, Q, R, S, Т (мс), смещение ST, мс.

Регистрация количественных показателей CO_2 во время выдоха проводилась с помощью ультразвукового проточного капнометра КП-01-«ЕЛАМЕД». Капнограмму записывали в состоянии относительного покоя. Регистрировали следующие показатели: показатель неравномерности дыхания (UB, %), долю мёртвого пространства в общей вентиляции (V_d/V_E , %), конечно-экспираторное парциальное давление CO_2 , ($P_{et}CO_2$, мм рт.ст.)

Применяли факторный анализ (метод главных компонент), принимали значения только сильных факторных нагрузок ($>|0,7|$), сумма дисперсий факторов, взятых в рассмотрение $> 0,5$. Построение нелинейной математической модели выполняли с помощью математического аппарата алгебраической модели конструктивной логики (АМКЛ) [16, 17].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Логика проведённого факторного анализа позволила проследить особенности формирования функциональных систем у школьников разных возрастов. В каждом возрастном периоде выделено несколько факторов – главных компонент, которые объединяют сильно коррелирующие между собой переменные, как следствие происходит перераспределение дисперсии между компонентами и получается максимально простая и наглядная структура факторов (табл. 1).

Согласно полученным данным, у школьников первого класса в связи со структурной и функциональной незрелостью элементов управления, дисфункциональные состояния ассоциировались с активацией стресс-лимитирующих механизмов, сопровождающихся снижением миокардиальных резервов. При этом необходимо заметить, что было выявлена гиперактивность вагальной активности, приводящая к дисфункции предсердного проведения и электрической нестабильности миокарда. Как известно недостаточные энергетические возможности отражались на метаболических процессах и являлись причиной дистрофических изменений в клетках мышечной ткани и миокарда и скелетных мышц, а одними из характерных проявлений у детей младшего школьного возраста является мышечная астения, церебрастения и дисбаланс вегетативной регуляции.

Вероятно, этот симптомокомплекс необходимо купировать активацией саногенетических механизмов в процессе комплексной физической реабилитации, которая должна включать массаж, физические упражнения, направленные на оптимизацию мышечного тонуса и укреплению мышечного корсета с системным

вовлечением всех мышечных групп и физические и дыхательные упражнения, направленные на активизацию внесердечных факторов кровообращения.

Таблица 1

Группировка показателей функционального состояния школьников разных классов в выделенных факторах

№	Факторы	Показатели	Классы			
			1 класс	5 класс	9 класс	11 класс
1	Симпатической централизации	ЧСС, уд/мин Амо, %		0,88207 0,93639		0,83303
2	Активности гомеостатической регуляции	SDNN, мс	-0,77914		0,81448	-0,8215
3	Электрического статуса и проводимости миокарда	Сегмент PQ, мс Сим. Т (βТ), ед Смещение ST, мс	-0,79721 -0,81227 -0,83907	0,861423	0,790238 -0,70977 0,706465	0,897141
4	Вагорегуляторно-капнический	PETCO ₂ мм рт.ст р NN50, %		0,738932 0,861423	0,83744	0,907564

Примечание: в таблице приведены значения только сильных факторных нагрузок ($> |0,7|$), сумма дисперсий факторов, взятых в рассмотрение $> 0,5$

Анализ состояния кардиореспираторной системы в учащихся 5 класса выявил, что признаками адаптации организма учащихся к комплексному влиянию факторов образовательной среды является усиление активности высших надсегментарных звеньев вегетативной регуляции, сопровождающихся возможностью компенсаторного включения системы дыхания. Соответственно коррекционные мероприятия должны быть направлены на формирование и поддержание саногенетических механизмов, имеющих вышеперечисленные точки приложения, а именно на снижение активности высших центров вегетативной регуляции и увеличением сегментарных влияний на хронотропную функцию сердца, ростом общей вариабельности объемных характеристик центрального кровообращения, обусловленным увеличением низкочастотных колебаний, тесно связанных с сегментарными регулирующими влияниями. Функциональные характеристики вентилаторной функции обследуемых детей определенным образом были оценены по газообменным процессам в легких. Высокие уровни легочной вентиляции при тахипноическом типе дыхания в покое являлись фактором, приводящим к снижению напряжения CO₂ в пробах выдыхаемого воздуха. Избыточное вымывание метаболической углекислоты из организма и формирование состояния гипокапнии вследствие гипервентиляции способствовало изменению парциального давления CO₂ в артериальной крови, развитию дыхательного алкалоза. Усиление вентиляции в состоянии покоя может быть связано с ослаблением гиперкапнического стимула

дыхания и повышением роли гипоксического в регуляции внешнего дыхания. Такие изменения обусловлены наличием дефицита кислорода в организме и деформацией кислородсвязывающей и кислородтранспортной системы. В связи с вышесказанным наиболее оптимальной программой физической реабилитации школьников 10–11 лет могли составить циклические упражнения аэробной направленности и респираторная тренировка, направленная на регуляторную оптимизацию функции внешнего дыхания с переключением регуляции с гипоксического на гиперкапнический стимул, увеличение толерантности к гипоксии и совершенствование всех звеньев механики дыхания.

Школьники 9 класса 14–15 лет характеризовались повышением активности парасимпатической и гуморальной гомеостатической регуляции. Гиперактивация этого звена регуляции вероятно не позволяло реализовывать мобилизационную функцию стресс-реализующих систем и снижению миокардиальных резервов, а возникающая дыхательная синусовая аритмия в состоянии покоя свидетельствовала о неэффективном кардиореспираторном функционировании, возможно на фоне психоэмоциональной лабильности и как следствие напряжения регуляторных механизмов. Рекомендуемые специальные коррекционные мероприятия: программы саморегуляции (аутотренинг, идиомоторные упражнения в управляемом расслаблении и напряжении, закаливание), дыхательная гимнастика с произвольным управлением акта дыхания и массаж.

С учётом увеличения нагрузки в условиях образовательной среды к 11 классу у школьников 16–17 лет было зарегистрировано включение всех выявленных 4-х факторов, влияющих на функциональное состояние кардиореспираторной системы. В компенсаторно-приспособительные механизмы развивающегося организма были вовлечены все возможные адаптационные резервы, что вызывало повышение напряжения механизмов регуляции и их истощение. Рекомендованные коррекционные мероприятия должны включать все вышеперечисленные для других возрастных групп, а вопрос о наиболее эффективном их сочетании и комбинировании может стать целью наших дальнейших исследований.

Таким образом, формирование функционального состояния школьников в процессе адаптации к средствам коррекции определялось многообразием включения различных компонентов единой функциональной системы, направленной на обеспечение приспособительного эффекта. Использование факторного анализа позволило, в этой связи, определить ведущие составляющие, на долю которых приходился наибольший вклад в реализацию адаптационных реакций. Предложенные программы коррекции предположительно будут максимально эффективно способствовать совершенствованию механизмов адаптации, расширению функциональных резервов организма учащихся.

При математическом моделировании дополнительно было выявлено, что показатели ФГИ и ВСР, в определённых диапазонах, являлись маркерами нарушения кардиогемодинамического функционирования у детей школьного возраста независимо от возраста. Так, к таким индикаторам были отнесены следующие показатели: дисперсия симметричности зубца Т ($d\beta T$, ед) в диапазоне

значений более 0,16 мс, депрессия сегмента ST более значений -0,017 мс и продолжительность зубца T в диапазоне менее 0,25 мс и более 0,27 мс.

Анализ полученных результатов исследования функционального состояния кардиореспираторной системы для практической качественно-количественной оценки организма школьников дал возможность по принципу равноправных голосований сформировать схему принятия решения при выявлении риска возникновения дисфункциональных состояний по маркерным показателям (табл. 2, табл. 3).

Таблица 2

Маркеры и значения их нормы, используемые в схеме принятия решений

№	Показатель	Норма	Вес показателя в %
1	ЧСС, уд/мин	70–90 + По возрасту	10 %
2	PQ, с	120–200	10 %
3	β_T , ед	< 0,72	10 %
4	АМо, %	< 40	10 %
5	pNN50%	27±12	10 %
6	SDNN, мс	40-80	10 %
7	PETCO ₂ , мм рт. ст.	35-45	10 %
8	d β_T , ед	<0,16	10 %
9	Смещение ST, мс	-0,017	10 %
10	T, мс	0,25–0,27	10 %

Таблица 3

Схема принятия решений при оценке риска возникновения дисфункциональных состояний кардиогемодинамики у школьников

≤30%	Низкий риск
30–60%	Средний риск
≥60%	Высокий риск

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С применением математических алгоритмов выявлено, что наиболее важные системообразующие показатели функционального состояния кардиореспираторной системы у школьников разных возрастов различны, а на фоне образовательной среды формируют специфические дисфункциональные состояния. Анализ полученных результатов позволил сформировать систему выявления рисков дисфункций кардиореспираторной системы у школьников, которая позволит оценить и определить направление коррекционных мероприятий функционального состояния.

Список литературы

1. Yong people's health in context. Health behavior in school aged Children (BSC) study: international report from 2001/2002 survey/ [Ed / Candace Currie et al.] – Copenhagen: WHO Regional Office for Europe. 2007. – 270 p.
2. Агаджанян Н. А. Оценка адаптационных возможностей организма и риск развития заболеваний / Агаджанян Н. А., Баевский Р. М., Берсенева А. П. – М.: Изд-во РУДН, 2006. – 284 с.
3. Маркасян А. А. Основы морфологии и физиологии организма детей и подростков / Маркасян А. А. – М.: Медицина, 1969. – 292 с.
4. Потапчук А. А. Лечебная физическая культура в детском возрасте: учеб.-метод. пособие / Потапчук А. А., Матвеев С. В., Дидур М. Д. – СПб.: Речь, 2006. – 468 с.
5. Смирнов В. М. Нейрофизиология и высшая нервная деятельность детей и подростков : учеб. пособие для студентов высш. учеб. заведений / Смирнов В. М. – 3-е изд., испр. и доп. – М.: Академия, 2007. – 464 с.
6. Скворцов И. А. Развитие нервной системы у детей (нейроонтогенез и его нарушения) : учеб. пособие / Скворцов И. А. – М.: Тривола, 2000. – 200 с.
7. Физиология роста и развития детей и подростков (теоретические и клинические вопросы) : практическое руководство : в 2 т. Т. 1 / под ред. А. А. Баранова, Л. А. Щеплягиной. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. – 432 с.
8. Факторный, дискриминантный и кластерный анализ : пер. с англ. / Дж.-О. Ким, Ч. У. Мьюллер, У. Р. Клекка [и др.] ; под ред. И. С. Енюкова. – М.: Финансы и статистика, 1989. – 215 с.
9. Минина Е. Н. Оптимизация скрининг-оценки кардиогемодинамики с использованием алгебраической модели конструктивной логики / Е. Н. Минина; под ред. проф. А. А. Хадарцева, В. А. Хромушина. – Москва : Русайнс, 2017. – 144 с.
10. Минина Е. Н. Анализ волны Т ЭКГ в фазовом пространстве в определении функциональных резервов миокарда / Е. Н. Минина // Ученые записки Таврического национального университета имени В. И. Вернадского. – 2013. – 26 (65), № 2. – С. 148–153.
11. Минина Е. Н. Фазовый портрет одноканальной ЭКГ в оценке функциональных резервов сердечно-сосудистой системы / Е. Н. Минина, Л. С. Файнзильберг // Вестник новых медицинских технологий. – 2014. – 21-3. – С. 22–27.
12. Файнзильберг Л. С. Компьютерная диагностика по фазовому портрету электрокардиограммы / Л. С. Файнзильберг. – К. Освита України, 2013. – 190 с.
13. Файнзильберг Л. С. Исследование диагностической ценности угла ориентации фазового портрета одноканальной ЭКГ как индикатора функционального состояния миокарда / Л. С. Файнзильберг, Е. Н. Минина // Клиническая информатика и телемедицина. – 2013. – Т. 9, № 10. – С. 33–42.
14. Файнзильберг Л. С. Оценка функционального состояния сердечно-сосудистой системы по величине разброса фазовых траекторий одноканальной ЭКГ / Л. С. Файнзильберг, Е. Н. Минина // Кибернетика и вычислительная техника. – 2014. – № 1. – С. 5–19.
15. Хромушин В. А. Программа построения алгебраических моделей конструктивной логики в биофизике, биологии и медицине / В. А. Хромушин, В. Ф. Бучель, В. А. Жеребцова, Т. В. Честнова // Вестник новых медицинских технологий. – 2008. – №4. – С. 173–174.
16. Хромушин В. А. Алгоритм и программа анализа результирующих импликант алгебраической модели конструктивной логики / В. А. Хромушин, О. В. Хромушин, Е. И. Минаков // XXXXVI научно-практическая конференция профессорско-преподавательского состава ТулГУ «Общественное здоровье и здравоохранение: профилактическая и клиническая медицина» Сборник статей. – Тула, 2010. – С. 138–148.

HUMAN SKELETAL MUSCLES CONTROL ORGANIZATION PROCESSES FEATURES DURING VARIOUS INTENSITY LOCOMOTIONS

Minina E. N., Bogach I. N.

V. I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Crimea, Russia

E-mail: cere-el@yandex.ru

In the process of growth and development of the child's body, a hoard of reserve capabilities is created, which provides the reliability of any biological system and is one of the general principles of individual development. It reflects the high adaptive effect of the development of the organism at each stage of ontogenesis against the background of heterochronous maturation of various functional systems at different periods of postnatal life, depending on their importance in providing vital functions and optimal adaptation of the organism to the conditions of existence. However, at school age, the educational process and environmental factors significantly affect the health of students against the background of physiological age features. In assessing the role of the educational environment in children's lives, one-sidedness is observed, its influence is considered only as a risk factor for the health of students, with a possible transition to the level of pathogenetic factor. Against the background of the action of pathogenetic factors, including those induced by the influence of the educational environment, there is an activation of sanogenetic factors that provide a productive interaction of the child's body with the environment and are designed to restore disturbed balance in the body.

Using factor analysis (the method of principal components) and mathematical modeling (an algebraic model of constructive logic) made it possible to study the nature of the functional relationships of parts of the whole organism and to reveal age-related features of sanogenesis in the process of growth and development in the educational environment.

It was revealed that the most important system-forming indicators of the functional state of the cardiorespiratory system are different for students of different ages, and specific dysfunctional states form against the background of the educational environment. Mathematical algorithms made it possible to identify age-related markers of the risk of dysfunctional states, on the basis of which a decision-making scheme was developed when they were used in assessing the level of a functional state and the direction of corrective measures.

Keywords: sanogenesis, mathematical modeling, factor analysis, age-related features.

References

1. *Young people's health in context. Health behavior at school aged children BSC: international report from 2001-2002 survey* [Ed / Candace Currie et al.] (Copenhagen: WHO Regional Office for Europe, 2007)
2. Agajanyan N. A., Baevskiy P. M., Berseneva A. P. *Evaluation of adaptive capabilities of the organism and the risk of disease*, 284 p. (Publishing House of People's Friendship University, Moscow, 2006).
3. Markasyan A. A. *Osnovy morfologii i fiziologii organizma detej i podrostkov*, 292 p. (M.: Medicina, 1969).

4. Potapchuk A. A., Matveev S. V., Didur M. D. *Lechebnaya fizicheskaya kul'tura v detskom vozraste: ucheb.-metod. Posobie*, 464 p. (SPb. : Rech', 2006).
5. Smirnov V. M. *Nejrofiziologiya i vysshaya nervnaya deyatel'nost' detej i podrostkov* : ucheb. posobie dlya studentov vyssh. ucheb. Zavedenij, 464 p. (M. : Akademiya, 2007).
6. Skvorcov I. A. *Razvitie nervnoj sistemy u detej (nejroontogenez i ego narusheniya)* : ucheb. Posobie, 200 p. (M. : Trivola, 2000).
7. *Fiziologiya rosta i razvitiya detej i podrostkov (teoreticheskie i klinicheskie voprosy)* : prakticheskoe rukovodstvo : v 2 t. T. 1 / pod red. A. A. Baranova, L.A. SHCHEplyaginoj, 432 p. (M. : GEOTAR-Media, 2006).
8. *Faktornyj, diskriminantnyj i klasternyj analiz* : per. s angl. / Dzh.-O. Kim, CH.U. M'yuller, U. R. Klekka [i dr.] ; pod red. I. S. Enyukova, 215 p. (M. : Finansy i statistika, 1989).
9. Minina E. N. *Optimizaciya skringing-ocenki kardiogemodinamiki s ispol'zovaniem algebraicheskoy modeli konstruktivnoj logiki*, 144 p. (Moskva: RUSAJNS, 2017).
10. Minina E. N. Analiz volny T EKG v fazovom prostranstve v opredelenii funkcional'nyh rezervov miokarda, *Uchenye zapiski Tavricheskogo nacional'nogo universiteta imeni V.I. Vernadskogo*, **26 (65)**, 2, 148 (2013).
11. Minina E. N., Fajnzil'berg L. S. Fazovyy portret odnokanal'noj EKG v ocenke funkcional'nyh rezervov serdechno-sosudistoj sistemy, *Vestnik novyh medicinskih tekhnologii*,. **21-3**, 22 (2014).
12. Fajnzil'berg L. S. Komp'yuternaya diagnostika po fazovomu portretu elektrokardiogrammy (K. Osvita Ukrainy, 2013).
13. Fajnzil'berg L. S., Minina E. N. Issledovanie diagnosticheskoy cennosti ugla orientacii fazovogo portreta odnokanal'noj EKG kak indikatora funkcional'nogo sostoyaniya miokarda, *Informatika i telemedicine*, **9**, 10. 33 (2013).
14. Fajnzil'berg L. S., Minina E. N. Ocenka funkcional'nogo sostoyaniya serdechno-sosudistoj sistemy po velichine razbroza fazovyh traektorij odnokanal'noj EKG, *Kibernetika i vychislitel'naya tekhnika*, **1**, 5 (2014).
15. Hromushin V. A., Buchel' V. F., ZHerebcova V. A., CHestnova T. V. Programma postroeniya algebraicheskikh modelej konstruktivnoj logiki v biofizike, biologii i medicine, *Vestnik novyh medicinskih tekhnologij*, **4**, 173 (2008)
16. Hromushin V. A., Hromushin O. V., Minakov E. I. Algoritm i programma analiza rezul'tiruyushchih implikant algebraicheskoy modeli konstruktivnoj logiki (XXXXVI nauchno-prakticheskaya konferenciya professorsko-prepodavatel'skogo sostava TulGU «Obshchestvennoe zdorov'e i zdravoohranenie: profilakticheskaya i klinicheskaya medicina», 138 (Tula, 2010).

УДК 612.763; 612.743

ОСОБЕННОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ ПРОЦЕССОВ УПРАВЛЕНИЯ СКЕЛЕТНЫМИ МЫШЦАМИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ЛОКОМОЦИЯХ РАЗЛИЧНОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ

*Моисеев С. А.¹, Михайлова Е. А.¹, Пискунов И. В.¹, Бобкова Е. Н.², Дубинин Г. В.²,
Городничев Р. М.¹*

¹*Великолукская государственная академия физической культуры и спорта, Великие Луки,
Россия*

²*Смоленская государственная академия физической культуры спорта и туризма, Смоленск,
Россия*

E-mail: sergey_moiseev@vlgafc.ru

Проведенное исследование показало, что вариативность средней амплитуды электромиограмм скелетных мышц, принимающих активное участие в реализации локомоций и имеющих достоверные различия в величинах электроактивности при спринтерском беге по прямой и виражу, характеризуется как низкая, за исключением m. vastus medialis, что, вероятно, является отражением основных корректирующих воздействий нервной системы для поддержания необходимых характеристик локомоций в различные фазы бегового шага. Показано, что при изменении условий реализации двигательной задачи пластичность системы управления произвольными локомоциями заключается в изменении количества элементов функциональной синергии и ее временной структуры. При беге по виражу с разной скоростью в синергии вовлекалось значительно меньшее количество мышц, причем акцент активности смещался к мышцам стороны тела, противоположной углу наклона туловища.

Ключевые слова: мышечные синергии; вариативность; локомоции; координационная структура.

ВВЕДЕНИЕ

Общепринятым является положение о том, что активность ряда мышц или мышечных групп при реализации двигательной задачи имеет модульную организацию [1–3]. Такая модель управления чаще всего описывается как мышечная синергия, представляющая собой набор мышц, синхронно активирующихся и имеющих схожую пространственно–временную структуру. Мышечные синергии, вероятно, способны описывать различные аспекты управления произвольными движениями человека, в том числе локомоций и могут отражать взаимосвязь между центральным управлением и моторным выходом [4–6].

Механизм образования мышечных синергий в процессе управления локомоторной активностью в основном рассматривался на двигательных моделях произвольной ходьбы человека с невысокой скоростью и при изменении скорости передвижения. Многие исследования приведены в контексте решения проблем восстановления локомоторной функции человека вследствие перенесенной травмы или болезни [7, 8]. Очевидно, что механизмы, используемые структурами

центральной нервной системы (ЦНС) в процессе регуляции локомоций на различных уровнях ее организации имеют отличительные особенности. Однако если в случае перенесенной травмы модификация моторной функции имеет явно компенсаторный характер, то в спортивной практике она не всегда очевидна. Известно, что хорошо освоенное движение регулируется по сформированной в процессе обучения моторной программе управления. При таком способе управления имеется возможность коррекции двигательного действия, на что указывает некоторая вариативность параметров моторного выхода. Это традиционно связывают с непрерывным поиском структурами ЦНС наиболее целесообразного способа выполнения двигательной задачи и, как правило, рассматривают как положительный аспект, являющийся частью адаптационного процесса [9].

Представлялось логичным выяснить, являются ли сформированные синергии пластичными, способными модифицироваться в разных условиях локомоторной активности, или же они реализуются как запрограммированный процесс, имеющий ограничения в отношении количества используемых элементов двигательной системы и их временной организации. Выяснение закономерностей формирования и модификации таких образований в различных условиях локомоций имеет важное значение для развития общей теории управления произвольными движениями человека и может служить основанием для разработки средств повышения эффективности тренировочного процесса спортсменов, специализирующихся в спринтерском беге. В связи с этим целью данного исследования явилось изучение особенностей модификации параметров моторного выхода при беге с различной скоростью и разным направлением движения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие 12 спортсменов, специализирующихся в беге на короткие дистанции, имеющих спортивную квалификацию от 1 разряда до КМС в возрасте от 21 до 24 лет. Моделировали следующие условия локомоторной активности: разбег, бег с максимальной скоростью при движении по прямой и виражу. Цикл шага делили на фазу опоры и переноса опорной ноги. В каждом экспериментальном условии обрабатывали 10 полных циклов шага в пяти попытках, выполняемых последовательно каждым испытуемым с интервалом отдыха 5 минут. Исследования проводились в специализированном зале для занятий легкой атлетикой Великолукской государственной академии физической культуры и спорта. Во время бега регистрировали электромиограммы (ЭМГ) шестнадцати билатеральных поверхностных мышц верхних и нижних конечностей: soleus (SOL), tibialis anterior (TA), biceps femoris (BF), rectus femoris (RF), vastus medialis (VM), vastus lateralis (VL), deltoideus posterior portion (DELTP), deltoideus anterior portion (DELTA). Регистрацию ЭМГ осуществляли, используя беспроводной 16-и каналный биомонитор ME 6000 (Финляндия) с частотой дискретизации 2000 Гц [10].

Интерференционные электромиограммы усреднялись в интервалах длиной 0,05 с и разделялись на периоды разбега и бега с максимальной скоростью, так, чтобы учитывать в каждом периоде минимум 10 последовательных двусторонних шагательных циклов. Рассчитывали среднюю амплитуду ЭМГ.

В отдельном случае в анализ включали значения электроактивности мышц всего временного ряда без разделения на фазы и периоды. Использовали метод главных компонент (РСА) для получения основных сигналов ЭМГ, являющихся отражением суммарной электроактивности всех регистрируемых скелетных мышц в определенном экспериментальном условии. Полученные таким образом ЭМГ–сигналы усредняли по группе испытуемых, применяли отрицательное экспоненциальное сглаживание и экстраполировали по времени относительно точки отсчета [11–13, 2].

Для изучения пространственно–временной архитектуры мышечной активации, т.е. для выявления синергетического взаимодействия скелетных мышц использовали факторный и регрессионный анализ [14–16, 6]. В качестве метода выделения факторов применяли анализ главных компонент. Для определения числа факторов использовали критерий Кайзера (учитывались факторы с собственными значениями не менее 1,0) и критерий объясняемой дисперсии (не менее 70 % дисперсии). Рассматривались только значимые факторные нагрузки с коэффициентом выше 0,7. Факторы, имеющие менее трех значимых высоких коэффициентов не рассматривались. Проводили множественный регрессионный анализ, где зависимой переменной выступала электроактивность мышцы, имеющая наибольшую факторную нагрузку, а независимыми – показатели других мышц со значимо высокими нагрузками внутри каждого фактора. Были составлены уравнения линейной регрессии, количественно описывающие линейные зависимости активности скелетных мышц, входящих в структуру синергии. Адекватность построенных регрессионных моделей проверяли по коэффициенту детерминации (не менее 70 %) и анализу распределения остатков.

Математико–статистическая обработка данных включала расчет среднего арифметического (M), ошибки среднего арифметического (m), медианы (Me), верхнего (Q_{up}) и нижнего (Q_{low}) квартилей, размаха вариации (R), квартильного размаха (IQR), коэффициента вариации (V). Для оценки достоверности различий при сравнении параметров в разных экспериментальных условиях использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с Post-Hoc анализом по критерию Newman-Keuls. Различия считали значимыми при $p < 0,05$. В некоторых случаях рассчитывали изменения, выраженные в процентах.

Все исследования проведены с соблюдением требований и принципов биомедицинской этики, сформулированными в Хельсинской декларации 1964 г. и одобрены биоэтическим комитетом Великолукской государственной академии физической культуры и спорта. Каждый участник представил добровольное письменное информированное согласие на участие в исследованиях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Электроактивность скелетных мышц верхних и нижних конечностей при беге по прямой и виражу имели отличительные особенности. Даже поверхностный визуальный анализ зарегистрированных электромиограмм в таких условиях обнаруживает ряд отличий амплитуды и частоты следования биопотенциалов.

Например, длительность электроактивности и частота следования биопотенциалов VM и VL правой ноги несколько выше при беге по прямой, чем по виражу (рис. 1).

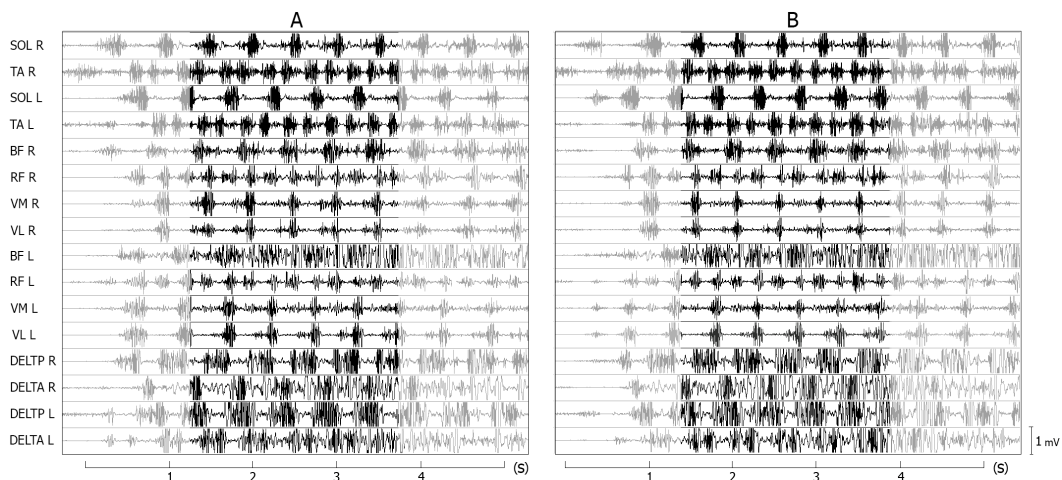


Рис. 1. Электромиограммы билатеральных скелетных мышц испытуемого П. И. во время бега по прямой (А) и виражу (В).

Анализ различий средней амплитуды ЭМГ мышц в разных фазах, периодах и направлениях бега выявил статистически значимые различия ЭМГ-активности ряда скелетных мышц, преимущественно правой стороны тела. Так, в фазе опоры во время разбега регистрировалась существенно большая электроактивность мышц антагонистов голени – TA, SOL правой конечности и мышц бедра – RF, VM и VL правой конечности (рис. 2). Поскольку размах значений электроактивности некоторых из названных мышц при беге по прямой оказался значительным, то для определения вариативности в данном случае учитывали ряд статистических параметров. Например, разница M и Me *m. soleus* правой конечности составила 19,15 мкВ, а для *m. vastus medialis* – 45,77 мкВ. В других приведенных мышцах она составила не более 10 мкВ. Коэффициенты вариативности находились в диапазоне от 33 % до 49 %. При беге по виражу, аналогично, установлена небольшая разница значений M и Me , за исключением *m. vastus medialis* – более 60 мкВ. Коэффициенты вариативности здесь составляли от 20 % до 51 %. В фазе переноса опорной ноги наблюдалась схожая картина, характеризуемая небольшими различиями в показателях вариации ЭМГ-активности за исключением *m. vastus medialis*.

Таким образом, анализируя ряд статистических параметров, характеризующих величину разброса значений можно говорить о низкой вариативности электроактивности большинства исследуемых мышц, имеющих достоверные различия при сопоставлении их параметров при беге по прямой и виражу, за исключением *m. vastus medialis* ЭМГ-активность которой оказалась более вариативна.

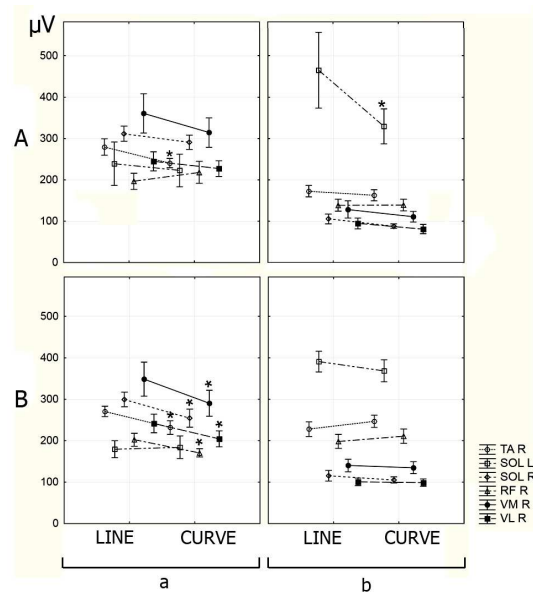


Рис. 2. Средняя амплитуда ЭМГ скелетных мышц при беге по прямой и виражу в разные фазы бегового шага. А – бег с максимальной скоростью, В – разбег. * – достоверность различий при $P < 0,05$; а – фаза опоры, б – фаза переноса опорной ноги

Вероятно, такие особенности ЭМГ-активности являются отражением основных корректирующих воздействий нервной системы, которые проявляются в вариативности локомоторных характеристик от шага к шагу, регистрируемых в стандартных экспериментальных условиях. Логично, что эти корректирующие воздействия должны быть адресованы к тем мышцам, которые обеспечивают выполнение локомоций в таких условиях. Для этих мышц, вероятно, требуется проявление более значительной активности для обеспечения необходимых характеристик локомоций в различные фазы бегового шага. В фазе отталкивания этими мышцами, по результатам наших исследований, оказались мышцы голени и бедра левой нижней конечности, где регистрировалась достоверно большая амплитуда ЭМГ в сравнении с бегом по прямой. Интересным также является факт, что вариативность ЭМГ-активности *m. vastus medialis* в обеих фазах шагательного цикла оказалась несколько выше, чем для других исследуемых мышц. Если исходить из предположения о том, что те мышцы, которые не являются активными элементами управляющей системы, могут выполнять удерживающую функцию, ограничивая число возможных степеней свободы кинематической цепи, то вариативность параметров ЭМГ-активности таких мышц должны быть минимальной. Напротив, мышцы, принимающие активное участие в движении, имеющие непосредственную целевую значимость, должны получать непрерывный поток управляющих сигналов от различных отделов ЦНС, и, соответственно, вариативность электроактивности их должны быть значительно выше. Таким образом, можно полагать, что относительно большая вариативность ЭМГ-

активности m. vastus medialis при беге по виражу обусловлена активностью нервной системы для поддержания устойчивости движущегося тела, возможно, его устойчивости во фронтальной плоскости.

Помимо рассмотрения особенностей мышечной электроактивности не менее важным вопросом при изучении координационной структуры локомоций является вопрос организации управления скелетными мышцами. Вероятно, управление мышечной активностью при беге с различными характеристиками может осуществляться с использованием механизма образования мышечных синергий и их модификацией при изменении условий локомоторной активности, таких как изменение направления или интенсивности [17, 18].

На рисунке 3 приведены мышечные синергии, установленные в нашем исследовании, и описывающие их параметры при беге по прямой и виражу. Следует отметить, что они имели различия как по временной организации, так и по амплитуде ЭМГ-сигнала.

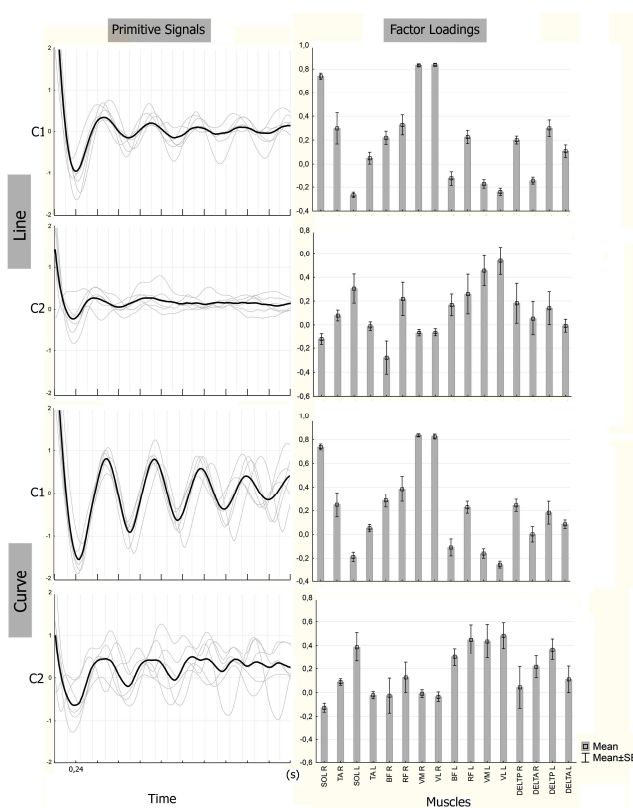


Рис. 3. Мышечные синергии. Основные ЭМГ – сигналы и факторные нагрузки при беге по прямой и виражу. C1 – синергия 1, C2 – синергия 2.

Основные сигналы ЭМГ-активности существенно различались в описываемых условиях ($p < 0,05$), а факторные нагрузки первой синергии при сравнении двух

экспериментальных условий в целом оказались сопоставимы, отмечались лишь незначительные различия в значениях их коэффициентов в диапазоне не более 0,2. В обоих случаях наибольшие коэффициенты регистрировались в *m. soleus*, *m. vastus medialis* и *m. vastus lateralis* правой нижней конечности и составляли 0,7–0,8. Аналогичная ситуация наблюдалась во второй установленной мышечной синергии, где основные ЭМГ–сигналы при беге по виражу имели достоверные отличия от бега по прямой ($p < 0,05$). Таким образом, нами установлены, различающиеся по параметрам пространственно-временной организации при беге с разным направлением движения.

Организация установленных нами мышечных синергий имела отличительные особенности и при разных скоростях передвижения, а также в разные фазы бегового шага. В фазе опоры при разбеге и беге с максимальной скоростью мышечные синергии оказались представлены практически однородным составом скелетных мышц (рис. 4 А,В).

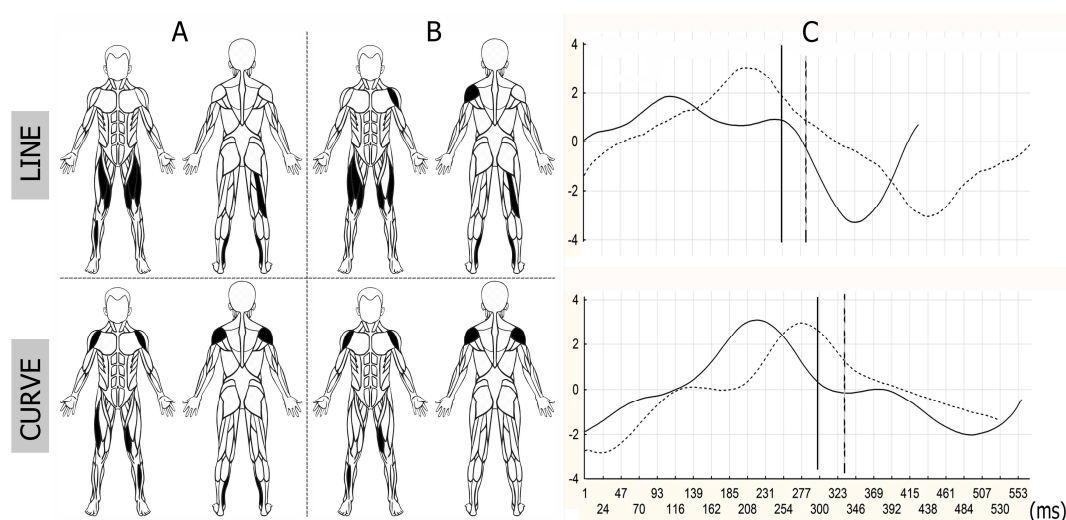


Рис. 4. Мышечные синергии при беге по прямой и виражу в фазах опоры и переноса опорной ноги с разной скоростью бега. А – разбег, фаза опоры; В – бег с максимальной скоростью, фаза опоры, заливкой показаны мышцы, имеющие синергетические зависимости; С – основные сигналы ЭМГ–активности: сплошной линией показан сигнал, соответствующий разбегу, пунктиром показан сигнал, соответствующий бегу с максимальной скоростью; соответствующими вертикальными линиями отмечены граничные моменты периодов опоры и переноса опорной ноги.

При беге по прямой синергетические зависимости выявлены более чем у половины исследуемых мышц в период разбега. В данном случае они описываются следующим уравнением линейной регрессии

$$Y = 34,75 + 0,33X_1 + 0,76X_2 + 0,97X_3 - 0,43X_4 + 0,42X_5 + 0,62X_6 - 0,55X_7 - 0,46X_8, \quad (1)$$

где Y- VM R, X₁- SOL R, X₂- TA R, X₃- SOL L, X₄- BF R, X₅- RF R, X₆- RF L, X₇- VM L, X₈- VL L.

При беге с максимальной скоростью в этих же условиях синергетические взаимодействия мышц различались, преимущественно, для мышц правого и левого бедра. Также отмечено подключение к синергии мышц верхнего плечевого пояса. Их взаимосвязи описываются уравнением линейной регрессии

$$Y = 16,28 - 0,26X_1 + 0,62X_2 + 0,40X_3 - 0,26X_4 - 0,22X_5 - 0,26X_6 + 0,31X_7 - 0,27X_8 - 0,23X_9, \quad (2)$$

где Y- VL L, X₁- SOL R, X₂- SOL L, X₃- BF R, X₄- RF R, X₅- VM R, X₆- VL R, X₇- VM L, X₈- DELTA L, X₉- DELTP L.

При беге по виражу с разной скоростью в синергии оказалось вовлечено значительно меньшее количество мышц. Во время разбега достоверные зависимости имели m. deltoideus posterior portion и deltoideus anterior portion левой стороны, m. vastus lateralis левой стороны, m. tibialis anterior левой стороны и m. soleus обеих нижних конечностей. В этих же условиях при беге с максимальной скоростью в синергию оказались включены m. deltoideus posterior portion и deltoideus anterior portion обеих конечностей, m. tibialis anterior и m. vastus medialis правой нижней конечности. Уравнение регрессии имело вид

$$Y = 73,33 - 0,46X_1 + 0,39X_2 + 0,23X_3 - 0,60X_4 - 0,37X_5, \quad (3)$$

где Y- DELTA L, X₁- TA R, X₂- VM L, X₃- DELTP R, X₄- DELTA R, X₅- DELTP L

Сравнивая установленные мышечные синергии при беге с разным направлением можно выделить следующие закономерности. При беге по виражу отмечалась достоверно большая электроактивность мышц синергии при разбеге ($p < 0,05$), а при беге с максимальной скоростью такой закономерности не прослеживалось, здесь ЭМГ-активность находилась на примерно одном уровне (рис. 4. С). Как в фазе опоры, так и при переносе опорной ноги длительность активности синергии оказалась достоверно выше при беге с максимальной скоростью, что является ожидаемым, поскольку время нахождения стопы на опоре при разбеге значительно короче, чем при беге с максимальной скоростью. Кроме того, при быстром беге фаза переноса удлиняется в сравнении с меньшей скоростью бега [19, 20].

Скелетно-мышечная система человека обладает большим числом степеней свободы, что при использовании механизма моторных программ может значительно затруднять процесс управления движением. Такая сложная система может регулироваться через простые исполнительные команды более низких уровней организации, находящимся между управляющим аппаратом и периферией – стволовым и спинальным. Выходными сигналами таких образований являются программы мышечных синергий, имеющих признаки согласованного управления параметрами электроактивности их структурных элементов. Причем при формировании взаимодействия между низшими нервными центрами управления и исполнительными элементами в процессе формирования синергии высшие отделы нервной системы могут постоянно не участвовать [9, 21]. В отношении регулярных

локомоций снижение размерности системы управления организуется таким образом, что каждый беговой шаг формируется как детерминированный комплекс согласованных движений. Действительно, нами установлено, что все исследуемые скелетные мышцы являлись в определенной фазе бегового шага частью мышечной синергии и имели признаки согласованного управления.

Таким образом, мышечные синергии при изменении условий функционирования мышечной системы оказываются пластичными в отношении организации ее пространственной и временной структуры, что отражается в коррекции количества элементов мышечной системы, образующих функциональную синергию, и длительности ее активности. Следует отметить, что выявленные и рассмотренные в статье мышечные синергии являются лишь частью тех синергий, которые могут формироваться в процессе выполнения двигательной задачи и его отдельных фаз. Некоторые авторы выделяют не менее пяти базовых синергий при выполнении ходьбы и точностных двигательных действий [11, 15, 3]. Нами были установлены как минимум 3 мышечные синергии в каждом экспериментальном условии, но ввиду ограниченности объема предоставляемого материала в работе были представлены только первые две. Однако, выявленные закономерности, касающиеся пространственно-временной структуры, оказались схожими для других установленных синергий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлены отличительные особенности ЭМГ-активности скелетных мышц при локомоциях, выполняемых в разном направлении передвижения, и степень вариативности их средней амплитуды электроактивности, являющейся отражением корректирующих воздействий нервной системы и направленной на повышение устойчивости движущегося тела во фронтальной плоскости. Показано, что при изменении условий реализации двигательной задачи пластичность системы управления произвольными локомоциями заключается в изменении количества элементов функциональной синергии и ее временной структуры.

Список литературы

1. D'avella A. Control of reaching movements by muscle synergy combinations / A. D'avella, F. Lacquaniti // *Frontiers in Computational Neuroscience*. – 2013. – No 7. – P. 42.
2. Giszter S. F. Motor primitives-new data and future questions / S. F. Giszter // *Current Opinion in Neurobiology*. – 2015. – No 33. – P. 156–165.
3. Латаш М. Л. Структурированная вариабельность как отличительный признак биологических процессов: на англ. языке / М. Л. Латаш // *Вопросы психологии*. – 2016. – №3. – С.120–126.
4. Patla A. E. Some characteristics of EMG patterns during locomotion: implications for the locomotor control process / Patla A. E. // *Journal of motor behavior*. – 1985. – No 17. – P. 443–61.
5. Kargo W. J. Individual premotor drive pulses, not time-varying synergies, are the units of adjustment for limb trajectories constructed in spinal cord / W. J. Kargo, S. F. Giszter // *Journal of Neuroscience*. – 2008. – No 28. – P. 2409–2425.
6. Coscia M. Muscle synergies and spinal maps are sensitive to the asymmetry induced by a unilateral stroke / M. Coscia, V. Monaco, C. Martelloni [et al.] // *Journal of NeuroEngineering and Rehabilitation*. – 2015. – No 12. – P. 39.

7. Subramanian S. K. Validity of movement pattern kinematics as measures of arm motor impairment post-stroke / S. K. Subramanian, J. Yamanaka, G. Chilingaryan, M. F. Levin // *Stroke*. – 2010. – No 41(10). – P. 2303–2308.
8. McMorland A. J. C. A neuroanatomical framework for upper limb synergies after stroke / A. J. C. McMorland, K. D. Runnalls, W. D. Byblow // *Frontiers in Human Neuroscience*. – 2015. – No 9. – P. 82.
9. Гельфанд И. М. Некоторые вопросы исследования движений / И. М. Гельфанд, В. С. Гурфинкель, М. Л. Цетлин, М. Л. Шик // *Модели структурно-функциональной организации некоторых биологических систем*. – М., 1966. – С. 264–276.
10. Команцев В. Н. Методические основы клинической электронейромиографии: Руководство для врачей / В. Н. Команцев, В. А. Заболотных. – СПб.: Лань, 2001. – 350 с.
11. Ivanenko Y. P. Five basic muscle activation patterns account for muscle activity during human locomotion / Y. P. Ivanenko, R. E. Poppele, F. Lacquaniti // *Journal of Physiology*. – 2004. – Vol. 556. – P. 267–282.
12. Hug F. Smoothing of electromyographic signals can influence the number of extracted muscle synergies / F. Hug, N. A. Turpin, S. Dorel, A. Guevel // *Clinical Neurophysiology*. – 2012. – No 123. – P. 1895–1896.
13. Steele K. M. The number and choice of muscles impact the results of muscle synergy analyses / K. M. Steele, M. C. Tresch, E. J. Perreault // *Frontiers in Computational Neuroscience*. – 2013. – No 7. – P. 105.
14. Ivanenko Y. P. Coordination of locomotion with voluntary movements in humans / Y. P. Ivanenko, G. Cappellini, N. Dominici [et al.] // *Journal of Neuroscience*. – 2005. – No 25. – P. 7238–7253.
15. Tresch M. C. Matrix factorization algorithms for the identification of muscle synergies: evaluation on simulated and experimental data sets / M. C. Tresch, V. C. Cheung, A. D'Avella // *Journal of Neuroscience*. – 2006. – No 95. – P. 2199–2212.
16. Золин П. П. Математическое моделирование биохимических процессов с применением регрессионного анализа: монография / П. П. Золин, В. М. Лебедев, В. Д. Конвай. – Омск: Изд-во Ом. гос. ун-та, 2009. – 344 с.
17. Olree K. S. Fundamental patterns of bilateral muscle activity in human locomotion / K. S. Olree, C. L. Vaughan // *Biological Cybernetics*. – 1995. – Vol. 73. – P. 409–414.
18. Витензон А. С. Новая концепция анализа электрической активности мышц при ходьбе человека в норме / А. С. Витензон, К. А. Петрушанская // *Физиология человека*. – 2004. – Т. 30, № 6. – С. 62–69.
19. Бальсевич В. К. Онтокинезиология человека: теория и практика / В. К. Бальсевич – М.: ТиПФК, 2000. – 350 с.
20. Немцев О. Б. О кинематике стопы в спринтерском беге по повороту / О. Б. Немцев, А. М. Доронин, А. В. Чечин // *Научно-теоретический журнал «Ученые записки»*. – 2012. – № 3 (85). – С. 133–136.
21. Gerasimenko Y. Electrical spinal stimulation, and imagining of lower limb movements to modulate brain-spinal connectomes that control locomotor-like behavior / Y. Gerasimenko, D. Sayenko, P. Gad // *Frontiers in Physiology*. – 2018. – No 19(9). – P. 1196.
22. Latash M. L. Motor control strategies revealed in the structure of motor variability / M. L. Latash, J. P. Scholz, G. Schoner // *Exercise and Sport Sciences Reviews*. – 2002. – No 30. – P. 26–31.

HUMAN SKELETAL MUSCLES CONTROL ORGANIZATION PROCESSES
FEATURES DURING VARIOUS INTENSITY LOCOMOTIONS

*Moiseev S. A.¹, Mikhailova E. A.¹, Piskunov I. V.¹, Bobkova E. N.², Dubinin G. V.²,
Gorodnichev R. M.¹*

¹*Velikie Luki State Academy of Physical Education and Sport, Velikie Luki, Russia*

²*Smolensk State Academy of Physical Education Sport and Tourism, Smolensk, Russia*

E-mail: sergey_moiseev@vlgafo.ru

It is known that a well-mastered movement is regulated by a pre-developed motor program. The number of muscles or muscle groups activity can have a modular organization during such a program implementation. This control model is most often described as muscle synergy, reflecting the relationship between central control and motor output. It is interesting whether the mechanism of muscle synergies formation is flexible, able to be modified in different locomotor activity conditions, or is a programmed process that has restrictions on the number of used motor system elements and their time organization. In this regard, the purpose of this study was to research the motor output parameters modification features during running at different speeds and directions of movement.

The study involved 12 short-distance running athletes. They performed running at maximum speed in a straight line and curve. Electromyograms of sixteen bilateral surface muscles of the upper and lower extremities were recorded during running. The principal component analysis (PCA) method was used to obtain the primitive signals of electromyograms, which are a reflection of the total electroactivity of all the recorded skeletal muscles in a certain experimental condition. Factor and regression analyses were used to study the space-time architecture of muscle activation, as well as to establish signs of synergy skeletal muscles electroactivity parameters consistent change.

The electrical activity parameters of most number of studied muscles, which have significant parameters differences during running in different directions, have low variability. M. vastus medialis EMG activity variability was assessed as average. Synergetic interrelations of skeletal muscles electroactivity differed, mainly, for right and left hip muscles at different phases of a straight line running. During curve running at different speeds, fewer muscles were involved in synergy, with the emphasis of activity shifted to the muscles opposite to the angle of the body trunk tilt. During curve running, there was significantly greater activity of synergy muscles during the run-up ($p < 0.05$) in comparison with running in a straight line, while during maximum speed running EMG activity was the same. Both in the support phase and in the transfer of the support leg, the duration of synergy activity was significantly higher when running at maximum speed. Established skeletal muscles EMG activity distinctive features during locomotions at different movement directions, as well as variability of their average EMG amplitude, are nervous system corrective effects reflection, which are probably aimed to the moving body lateral stability increasing. It is shown that during changing the motor program implementation conditions voluntary movements control system plasticity lies in changing of the number of functional synergy elements and its time structure.

Keywords: muscle synergy; variability; locomotion; coordination structure.

References

1. D'Avella A., Lacquaniti F. Control of reaching movements by muscle synergy combinations, *Frontiers in Computational Neuroscience*, **7**, 42 (2013).
2. Giszter S. F. Motor primitives-new data and future questions, *Current Opinion in Neurobiology*, **33**, 156 (2015).
3. Latash M. L. Structural variability as a distinctive feature of biological processes, *Question of psychology*, **3**, 120 (2016).
4. Patla A. E. Some characteristics of EMG patterns during locomotion: implications for the locomotor control process, *Journal of motor behavior*, **17**, 443 (1985).
5. Kargo W. J., Giszter S. F. Individual premotor drive pulses, not time-varying synergies, are the units of adjustment for limb trajectories constructed in spinal cord, *Journal of Neuroscience*, **28**, 2409 (2008).
6. Coscia M., Monaco V., Martelloni C., Rossi B., Chisari C., Micera S. Muscle synergies and spinal maps are sensitive to the asymmetry induced by a unilateral stroke, *Journal of NeuroEngineering and Rehabilitation*, **12**, 39 (2015).
7. Subramanian S. K., Yamanaka J., Chilingaryan G., Levin M. F. Validity of movement pattern kinematics as measures of arm motor impairment post-stroke, *Stroke*, **41** (10), 2303 (2010).
8. McMorland A. J. C., Runnalls K. D., Byblow W. D. A neuroanatomical framework for upper limb synergies after stroke, *Frontiers in Human Neuroscience*, **9**, 82 (2015).
9. Gel'fand I. M., Gurfinkel' V. S., Tsetlin M. L., Shik M. L. Some questions of motion research, *Proceedings of Conference "Models of structural and functional organization of some biological systems"*, edited by Gel'fand I. M., 264 p. (Nauka, Moscow, 1966).
10. Komantsev V. N., Zabolotnykh V. A. *Methodical bases of clinical electroneuromyography: a Guide for physicians*, 350 p. (LAN, Saint-Petersburg., 2001).
11. Ivanenko Y. P., Poppele R. E., Lacquaniti F. Five basic muscle activation patterns account for muscle activity during human locomotion, *Journal of Physiology*, **556**, 267 (2004).
12. Hug F., Turpin N. A., Dorel S., Guevel A. Smoothing of electromyographic signals can influence the number of extracted muscle synergies, *Clinical Neurophysiology*, **123**, 1895 (2012).
13. Steele K. M., Tresch M. C., Perreault E. J.. The number and choice of muscles impact the results of muscle synergy analyses, *Frontiers in Computational Neuroscience*, **7**, 105 (2013).
14. Ivanenko Y. P., Cappellini G., Dominici N., Poppele R. E., Lacquaniti F. Coordination of locomotion with voluntary movements in humans, *Journal of Neuroscience*, **25**, 7238 (2005).
15. Tresch M. C., Cheung V. C., D'Avella A. Matrix factorization algorithms for the identification of muscle synergies: evaluation on simulated and experimental data sets, *Journal of Neuroscience*, **95**, 2199 (2006).
16. Zolin P. P., Lebedev V. M., Konvay V. D. *Mathematical modeling of biochemical processes using regression analysis: monograph*, 344 p. (Publishing house Om. state University, Omsk, 2009).
17. Olree K. S., Vaughan C. L. Fundamental patterns of bilateral muscle activity in human locomotion, *Biological Cybernetics*, **73**, 409 (1995).
18. Vitenzon A. S., Petrushanskaya K. A. A New Approach to the analysis of normal muscle electrical activity during walking in humans, *Human Physiology*, **3** (6), 62 (2004).
19. Bal'sevich V. K. *Ontokinesiology of man: theory and practice*, 350 p. (Theory and Practice of Physical Culture, Moscow, 2000).
20. Nemtsev O. B., Doronin A. M., Chechin A. V. On the kinematics of the foot in the sprint race on the turn, *Scientific-theoretical journal "Scientific notes"*, **3**(85), 133 (2012).
21. Gerasimenko Y. P., Sayenko D., Gad P., Kozesnik J., Moshonkina T., Grishin A., Pukhov A., Moiseev S., Gorodnichev R., Selionov V., Kozlovskaya I., Edgerton V. R. Electrical spinal stimulation, and imagining of lower limb movements to modulate brain-spinal connectomes that control locomotor-like behavior, *Frontiers in Physiology*, **19**(9), 1196 (2018).
22. Latash M. L., Scholz J. P., Schoner G. Motor control strategies revealed in the structure of motor variability, *Exercise and Sport Sciences Reviews*, **30**, 26 (2002).

УДК 612.76

ИНФОРМАТИВНОСТЬ ПОКАЗАТЕЛЕЙ, ХАРАКТЕРИЗУЮЩИХ ВЕГЕТАТИВНЫЙ СТАТУС СПОРТСМЕНА ПРИ МЫШЕЧНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

*Петрушкина Н. П.¹, Коломиец О. И.¹, Латюшин Я. В.¹, Воровский С. Н.²,
Звягина Е. В.¹*

¹*ФГБОУ ВО «Уральский государственный университет физической культуры», Челябинск,
Россия*

²*Медицинская академия имени С. И. Георгиевского (структурное подразделение) ФГАОУ ВО
«Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского», Симферополь,
Республика Крым, Россия
E-mail: dokchel@mail.ru*

Цель исследования состояла в оценке информативности показателей вегетативного статуса спортсменов, характеризующих состояние спортсмена и возникновение «перетренированности» при мышечной деятельности. Используя во время сна (480 минут) Firstbeat-мониторинг изучали особенности вегетативной регуляции по таким показателям как: время релакса и время стресса, показатели сердечнососудистой деятельности и потребления кислорода, особенности энергообмена. Основная группа включала 16 спортсменов, у которых время стресса в период сна превышало референтные значения; у 16 спортсменов контрольной группы оно укладывалось в пределы нормы. Другие классически распознаваемые признаки перетренированности (снижение спортивных результатов, жалобы на ухудшение самочувствия, расстройство тончайшей двигательной координации и др.) у спортсменов обеих групп отсутствовали. Обнаруженные достоверные различия изучаемых показателей в выделенных группах свидетельствуют об их информативности и возможности использования их при мониторинге состояния спортсмена в процессе тренировочной деятельности.

Ключевые слова: вегетативный статус, мышечная работа, спортсмены, Firstbeat-мониторинг, перетренированность.

ВВЕДЕНИЕ

При систематической мышечной работе (тренировочная и соревновательная деятельность) вследствие неправильной ее организации или при действии дополнительных неблагоприятных факторов возможно возникновение перетренированности, приводящей не только к снижению спортивной эффективности, но и к возникновению нарушений в состоянии здоровья. Перетренированность как состояние, характеризующееся снижением работоспособности и ухудшением физического и нервно-психического состояния спортсмена, постоянно находится в зоне внимания спортивных физиологов и врачей [1–5].

Профилактика перетренированности при мышечной работе любой интенсивности достигается не только коррекцией организации тренировочного

процесса, но и в значительной степени и полноценным восстановлением после тренировки, что подразумевает повышение физической и психологической реактивности, выносливости и работоспособности и т. д., находящихся под контролем вегетативной системы [4–6].

Известно, что симпатический отдел вегетативной нервной системы отвечает за реализацию стрессовых реакций и процессы адаптации, парасимпатический – в основном, за процессы восстановления. Соразмерность этих процессов обеспечивает нормальное функционирование организма, полноценную деятельность и сохранение здоровья. Дискоординация симпатической и вагусной регуляции при систематической интенсивной мышечной работе (занятия спортом) может быть первым признаком перетренированности.

Ранее при оценке характера восстановления спортсменов, находящихся под нашим наблюдением, рассматривались различные характеристики вегетативного статуса, поскольку он является интегральным показателем состояния спортсмена, как во время выполнения спортивной деятельности, так и на различных этапах восстановления. На основе результатов круглосуточного наблюдения состояния спортсменов нами проводилась оценка характера адаптации к конкретной мышечной работе, выявлялись «слабые места» спортсмена, прогнозировалась успешность его деятельности, и своевременно корректировались как тренировочный процесс, так и программа восстановления [7–11].

Очевидно, что мониторинг функционального состояния спортсмена требует выбора максимально информативных показателей, позволяющих выявить признаки перетренированности еще на «доклинической» стадии ее развития. Для проведения такого мониторинга спортсмена и раннего выявления признаков перетренированности предпочтительна оценка его состояния в «полевых» условиях [5, 12–14]. В этих случаях эффективно применение простых (доступных в исполнении и оценке) методик. Однако чаще рассматриваются биохимические и гормональные показатели, отражающие изменение метаболизма [12, 15], причем выполнение таких исследований отличается инвазивностью методов, применением специального оборудования, дорогостоящих реактивов и т.д. Некоторая неопределенность при трактовке полученных при этом результатов связана и с тем фактом, что имеет место регистрация их в конкретные моменты времени.

В связи с этим заслуживают внимания мониторинговые аппаратные (неинвазивные) исследования, позволяющие непрерывно (ежесекундно) фиксировать функциональные изменения в основных системах жизнеобеспечения не только во время тренировки, но и в период позднего восстановления [12, 16]. Характеристики вегетативного статуса, выбранные нами ранее для оценки эффективности восстановления, по-видимому, могут быть информативными и для выявления ранних признаков перетренированности при мышечной работе.

Цель данного исследования состояла в оценке показателей вегетативного статуса, отражающих состояние перетренированности спортсменов на «доклинической» стадии его манифестации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Этическое разрешение на проведение этого исследования было получено в Комитете по этике УралГУФК. Испытуемые были предупреждены о рисках и преимуществах данного проекта и дали письменное согласие на добровольное участие в исследовании. Эксперимент был проведен в соответствии с положениями Хельсинкской Декларацией этических принципов для исследований с участием людей.

В исследование были включены 32 спортсмена 18–20-летнего возраста сходной спортивной квалификации, занимающиеся циклическими видами спорта.

При выполнении исследования использовали Firstbeat-bodyguard измерения (компания Firstbeat-Technology-Ltd, Ювяскюля, Финляндия) и проводили оценку результатов мониторинга ряда физиологических показателей в течение сна [13, 18, 19]. Мониторинг выполнялся в течение восьми часов.

Традиционно, анализ ВСР выполняется во временной или частотной областях. В анализе частотной области считается, что высокочастотный (HF ms^2 , 0.15-0.40 Гц) диапазон ВСР указывает на парасимпатическую регуляцию, тогда как низкочастотный (LF ms^2 , 0.04-0.15 Гц) диапазон отражает как парасимпатическую, так и симпатическую регуляцию. Соотношение LF/HF (% у.е.) – показатель вегетативного баланса, используют для оценки баланса между симпатическими и парасимпатическими отделами вегетативной нервной системы. Значения соотношения LF/HF, близкие к единице ($=1$, 50 %), свидетельствуют об относительном балансе тонических симпатических и парасимпатических влияний на сердечную деятельность. Высокие (>1 , >50 %) значения коэффициента LF/HF- отражают преобладание тонических симпатических влияний на сердечную деятельность; низкие значения (<1 , <50 %) – преобладание парасимпатического влияния.

Технология Firstbeat использует вариабельность сердечного ритма (BCR) в сочетании с методами математической обработки сигнала и документирования вегетативной регуляции нервной системы человека.

Начиная с данных сердцебиения (ЧСС макс, миним), аналитическая система Firstbeat вычисляет и создает цифровую модель человеческого тела, описывающую основные физиологические процессы, такие как частота дыхания (ЧД макс, миним), потребление кислорода (VO_2max), общий расход энергии (ккал), в том числе за счет углеводов или жиров, уровень потребления кислорода в постнагрузочный период, реакции на стресс и восстановление (индексы) и др. Полученные результаты обрабатываются с помощью программного обеспечения (Firstbeat версия 5.3.0.4), что позволяет не только рассмотреть индивидуальные особенности указанных выше показателей вегетативного контроля, на их основе выявить признаки индексу восстановления [13].

Таким образом, по данным мониторингирования во время сна, была проведена индивидуальная оценка традиционных показателей (среднее, максимальное и минимальное значение) частоты сердечных сокращений (ЧСС), степени преобладания тонуса симпатического или парасимпатического отдела вегетативной нервной системы, устойчивости к гипоксии (показатели потребления кислорода – среднее и максимальное значение и посттренировочное потребление кислорода), а

также характер и уровень метаболизма (метаболический эквивалент, максимальные аэробные возможности и общий энергообмен).

На первом этапе биостатистического анализа для оценки нормальности распределения изучаемого признака проводили вычисление нормированных коэффициентов асимметрии и эксцесса [1], и далее – расчет средних значений. В исследование были включены спортсмены, у которых значения признаков укладывались в нормальное распределение, поэтому полученные данные были обработаны традиционными биометрическими методами: расчет средних, ошибок средних и сравнение средне-групповых значений по критерию Стьюдента [4]. Различия считали достоверными при 95 % уровне значимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты представлены в таблицах. Как следует из данных таблицы 1, в обеих группах в период сна преобладали процессы восстановления, однако качество восстановления в основной группе оказалось достоверно хуже, чем в контрольной группе. Об этом свидетельствуют достоверные различия показателей тонуса различных отделов вегетативной нервной системы, вегетативного баланса ($1,46 \pm 0,04$ – в основной и $1,07 \pm 0,03$ – в контроле) – ($t=7,62$ - $p<0,05$) и более высокий индекс восстановления в контрольной группе ($243,3 \pm 8,9$), чем в основной ($129,4 \pm 0,9$) – ($t=12,7$ - $p<0,05$). Показатель вегетативного баланса в контрольной группе спортсменов приближался к единице, что подтверждает преобладание вагусного влияния и, соответственно, более высокого уровня восстановления организма во время сна.

Таблица 1
Показатели качества восстановления спортсменов во время сна

Показатели	Группы, средние $\pm$ ошибка, min-max значения, значение критерия Стьюдента		
	основная	контрольная	t
	M $\pm$ m	M $\pm$ m	
Время релакса, в %	68,0 $\pm$ 1,9	80,0 $\pm$ 2,1	<u>4,26*</u>
Время стресса, в %	32,0 $\pm$ 0,1	20,0 $\pm$ 0,2	<u>4,84</u>
Преобладание тонуса парасимпатической нервной системы, у.е	118,2 $\pm$ 4,3	138,2 $\pm$ 4,0	<u>3,41</u>
Преобладание тонуса симпатической нервной системы, у.е.	132,4 $\pm$ 3,8	102,8 $\pm$ 5,6	<u>5,04</u>
Индекс восстановления	129,4 $\pm$ 0,9	243,3 $\pm$ 8,9	<u>12,7</u>
Показатель вегетативного баланса (симпатикус:вагус)	1,46 $\pm$ 0,04	1,07 $\pm$ 0,03	<u>7,62</u>

Примечание: * – различия достоверны ($p<0,05$)

Как следует из данных, представленных в таблице 2, средние значения ЧСС в исследуемых группах во время сна достоверно различались: $61,0 \pm 1,5$ уд/мин (в основной) и $57,1 \pm 1,3$ уд/мин (в контрольной) ($t=5,12$ - $p<0,05$). При этом у спортсменов изучаемых групп и минимальные, и максимальные значения ЧСС имели существенные различия, соответственно: ($t=7,44$) и ($t=3,55$) - $p<0,05$. Более высокие значения минимальной ($49,3 \pm 0,9$) и максимальной ЧСС ($110,2 \pm 3,2$) в основной группе также свидетельствуют о преобладании у них тонуса симпатической нервной системы, т.е. о более низком, чем в контроле, уровне восстановления и появлении перетренированности.

Таблица 2

Характеристика частоты сердечных сокращений у спортсменов в период сна

Показатели	Группы, средние $\pm$ ошибка, min-max значения, значение критерия Стьюдента		
	основная	контрольная	t
	M $\pm$ m	M $\pm$ m	
Среднее значение ЧСС во время сна, уд в мин	$61,0 \pm 1,5$	$57,1 \pm 1,3$	<u>5,12*</u>
Минимальное значение ЧСС во время сна, уд в мин	$49,3 \pm 0,9$	$42,2 \pm 0,2$	<u>7,44</u>
Максимальное значение ЧСС во время сна, уд в мин	$110,2 \pm 3,22$	$61,2 \pm 1,51$	<u>3,55</u>

Примечание: * – различия достоверны ($p<0,05$)

Холинэргическое влияние на уровень потребления кислорода в фазе позднего восстановления характеризуется снижением потребления кислорода, что, в свою очередь, является признаком экономизации метаболических процессов (состояние тренированности и хорошей спортивной формы). В данном исследовании среднее значение потребления кислорода во время сна в основной группе спортсменов было сходным и составляло $3,4 \pm 0,1$ мл/кг/мин, в контрольной – $3,7 \pm 0,2$ мл/кг/мин ($t=1,45$ - $p>0,05$). Однако, максимальное потребление кислорода в основной группе оказалось в достоверно выше ($t=11,60$ - $p<0,05$), чем в контрольной, соответственно: $14,8 \pm 0,6$ мл/кг/мин и $6,3 \pm 0,4$ мл/кг/мин.

Далее были исследованы особенности потребления кислорода и метаболизма в период сна. Количество кислорода, необходимого для окисления накопившихся в организме недоокисленных продуктов обмена, соответствует показателю посттренировочного потребления кислорода в покое, который составил, соответственно: $0,87 \pm 0,07$ мл/кг в основной и $0,59 \pm 0,04$ мл/кг – в контрольной группе ($t=3,66$ - $p<0,05$). Более высокие значения этих показателей во время сна спортсменов основной группы, по-видимому, свидетельствуют о появлении

признаков перетренированности еще в период срочного восстановления (в период мышечной работы). Наблюдение динамики этих показателей на протяжении суток, особенно в период срочного восстановления, позволит в дальнейшем определить этот сдвиг во времени.

Таблица 3

**Особенности потребления кислорода и метаболизма в период сна
обследованных спортсменов**

Показатели	Группы, средние $\pm$ ошибка, min-max значения, значение критерия Стьюдента		
	основная	контрольная	t
	M $\pm$ m	M $\pm$ m	
Среднее значение потребления кислорода, в мл/кг/мин	3,8 $\pm$ 0,2	3,5 $\pm$ 0,2	0,98
Максимальное потребление кислорода, в мл/кг/мин	14,8 $\pm$ 0,6	6,3 $\pm$ 0,4	<u>11,60</u>
Посттренировочное потребление кислорода в покое, в мл/кг	0,87 $\pm$ 0,07	0,59 $\pm$ 0,04	<u>3,66</u>
Метаболический эквивалент, в мл/кг/мин/3,5	8,50 $\pm$ 0,63	7,80 $\pm$ 0,22	1,15
Общий энергообмен (в ккал)	603,20 $\pm$ 36,13	359,90 $\pm$ 16,36	<u>6,10</u>
Соотношение обменных процессов «углеводы/жиры»	0,70 $\pm$ 0,03	0,82 $\pm$ 0,04	<u>2,44</u>

Примечание: * – различия достоверны ($p < 0,05$)

Уровень метаболизма в покое отражает качество и скорость восстановления, в связи с чем были изучены такие показатели как: метаболический эквивалент (эквивалент обмена веществ), общий энергообмен и соотношение обменных процессов «углеводы/жиры» (таблица 3). Хотя уровни метаболического эквивалента, рассчитанные в мл/кг/мин/3,5, достоверно не различались: в основной – 8,5 $\pm$ 0,63 мл/кг/мин/3,5 и 7,8 $\pm$ 0,22 – в контрольной группе ($t=1,15$ - $p > 0,05$), показатели общего энергообмена в основной группе почти в два раза превышали таковой в контрольной группе: 603,2 $\pm$ 36,13 против 359,9 $\pm$ 16,36 ккал ($t=6,11$ - $p < 0,05$), причем энергообмен за счет жиров также оказался достоверно выше в основной группе спортсменов, в основной и контрольной группах, соответственно: 0,70 $\pm$ 0,03 и 0,82 $\pm$ 0,04 ($t=2,44$ - $p < 0,05$). Выявленные различия свидетельствуют о развитии перетренированности у спортсменов, относящихся к основной группе.

Таким образом, при Firstbeat-мониторинге спортсменов, имеющих нарушение структуры сна как первого признака нарушения вегетативной регуляции, были зарегистрированы значительные изменения ряда показателей висцеральных функций. Динамика и разброс ЧСС в покое, максимальное потребление кислорода и посттренировочное потребление кислорода, общий энергообмен и соотношение обменных процессов («углеводы/жиры»), а также индекс восстановления и показатель вегетативного баланса, указывает на нарушение процессов восстановления. Подчеркнем, что данное исследование касалось спортсменов, не имеющих явных признаков перетренированности (снижение спортивных результатов, жалобы на ухудшение самочувствия, расстройство тончайшей двигательной координации и др.). Это факт указывает на возможности использования изученных показателей для раннего выявления «перетренированности» при систематической мышечной деятельности, что позволит не только корректировать тренировочный процесс, но и своевременно начать проведение реабилитационных мероприятий, направленных на восстановление спортсмена.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При мониторинге вегетативной регуляции висцеральных функций во время сна зарегистрированы однонаправленные достоверные различия изученных показателей в группе спортсменов с ранними признаками перетренированности.

Качество восстановления во время сна в основной группе оказалось достоверно хуже, чем в контрольной группе.

Более выраженное симпатическое влияние в основной группе, подтверждают высокий индекс восстановления, высокие значения минимальной и максимальной ЧСС, показатели потребления кислорода и особенности энергообмена, зафиксированные во время сна.

Полученные результаты свидетельствуют об информативности показателей, характеризующих вегетативный статус спортсмена, и возможности применения их для раннего распознавания перетренированности.

Исследование выполнено в рамках научного сотрудничества ФГБОУ ВО «Уральский государственный университет физической культуры», г. Челябинск, Россия и Медицинской академии имени С. И. Георгиевского (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского», г. Симферополь, Республика Крым, Россия.

Список литературы

1. Баевский Р. М. Проблема оценки и прогнозирования функционального состояния организма и ее развитие в космической медицине / Р. М. Баевский // Успехи физиологических наук. – 2006. – Т. 37, № 3. – С. 42–57.
2. Быков Е. В. Функциональная диагностика с использованием современных информационных технологий в управлении тренировочным процессом спортсменов / Е. В. Быков, О. В. Балберова, А. В. Чипышев, О. И. Коломиец, И. Н. Оreshкина, Е. Г. Сидоркина, Д. М. Матюхов, Е. В. Леконцев

- // В сборнике: «Актуальные вопросы реабилитации, лечебной и адаптивной физической культуры и спортивной медицины». Материалы Всероссийской научно-практической конференции. – 2018. – С. 45–53.
3. Врублевский Е. П. Морфофункциональные аспекты отбора и тренировки спортсменов в скоростно-силовых видах легкой атлетики / Е. П. Врублевский, В. Ф. Костюченко // Ученые записки университета им. П. Ф. Лесгафта. – 2009. – № 4 (50). – С. 33–38.
 4. Костюченко В. Ф. Особенности индивидуальной тренировочной деятельности спортсменов высокой квалификации в годичном цикле подготовки / В. Ф. Костюченко, Е. П. Врублевский // Ученые записки университета им. П. Ф. Лесгафта. – 2009. – № 3 (49). – С. 39–43.
 5. Таймазов В. А. Психофизиологическое состояние спортсмена (Методы оценки и коррекции) : практ. руководство / В. А. Таймазов, Я. В. Голуб. – СПб. : Олимп, 2004. – 400 с.
 6. Василец В. В. Сравнительный анализ изменений компонентного состава тела под влиянием тренировочной нагрузки оздоровительного характера / В. В. Василец, В. Ф. Костюченко, Е. П. Врублевский // Ученые записки университета им. П. Ф. Лесгафта. – 2015. – № 1 (119). – С. 48–53.
 7. Коломиец О. И. Синхронизированное музыкальное воздействие как средство восстановления спортсменов (единоборства) / О. И. Коломиец, Е. В. Быков, Н. П. Петрушкина // Педагогико-психологические и медико-биологические проблемы физической культуры и спорта. – 2017 – Т. 12, № 1. – С. 167–174.
 8. Коломиец О. И. Особенности метаболических адаптационных изменений при различных физических нагрузках / О. И. Коломиец, Н. П. Петрушкина, Е. В. Быков // Наука. Инновации. Технологии. – 2017. – № 1. – С. 207–216.
 9. Коломиец О. И. Психофункциональное состояние спортсменов с ациклической направленностью тренировочного процесса / О. И. Коломиец, Н. П. Петрушкина, Е. В. Быков // Приложение международного научного журнала "Вестник психофизиологии". – 2018. – № 1. – С. 72–75.
 10. Коломиец О. И. Качество восстановительных процессов спортсменов после аэробных нагрузок и после авиаперелета / О. И. Коломиец, Н. П. Петрушкина, Е. В. Быков // «Вестник восстановительной медицины». – 2018 – № 2. – С. 124–128.
 11. Коломиец О. И. Анализ качества восстановления спортсменов на основе firstbeat-мониторинга (вариабельность сердечного ритма) / О. И. Коломиец, Е. В. Быков, Н. П. Петрушкина // Научно-спортивный вестник Урала и Сибири. – 2019. – №3 (23). – С. 3–14.
 12. Коломиец О. И. Современные технологии анализа качества тренировочного и восстановительного процесса спортсменов. Методические рекомендации / О. И. Коломиец, Е. В. Быков, Н. П. Петрушкина / под ред. Е. В. Быкова – Челябинск, 2019. – 50 с.
 13. Шепилов А. О. Мониторинг морфофункционального и метаболического состояния юных пловцов / А. О. Шепилов, А. В. Ненашева, А. В. Шевцов, Я. В. Латюшин, И. В. Изаровская // Человек. Спорт. Медицина. – 2018. – Т. 18, № 1. – С. 60–73. DOI: 10.14529/hsm180105
 14. Харина И. Ф. Особенности психофизиологических показателей студентов с признаками дефицита внимания в условиях сочетанных умственных и физических нагрузок / И. Ф. Харина, Е. В. Звягина, Е. В. Быков, О. А. Макунина // Вестник Новосибирского государственного педагогического университета. – 2018. – Т. 8, № 3. – С. 181–197.
 15. Никулин Б. А. Клинико-лабораторные показатели в системе медико-биологического контроля за спортсменами / Б. А. Никулин // Спортивная медицина : национальное руководство. – М. : ГЭОТАР-Медиа. – 2012. – С. 281–313.
 16. Быков Е. В. Методологические подходы при организации научных исследований в сфере физической культуры и спорта / Е. В. Быков, О. И. Коломиец, Н. П. Петрушкина, Н. А. Симонова // Педагогико-психологические и медико-биологические проблемы физической культуры и спорта. – 2019. – Том 14, № 1 – С. 176–184.
 17. Brosschot J. F. Does unconscious stress play a role in prolonged cardiovascular stress recovery? / Brosschot J. F., Geurts S. A., Kruizinga I., Radstaak M., Verkuil B., Quirin M. and Kompier M. A. // Stress Health. – 2014. – Aug;30(3). – P. 179–87. doi: 10.1002/smi.2590.
 18. Chouchou F. Heart rate variability: a tool to explore the sleeping brain? / Chouchou F. & Desseilles M. // Front Neurosci. – 2014. – 8. – P. 402. doi:10.3389/fnins.2014.00402. <https://dx.doi.org/10.3389/fnins.2014.00402>.

19. Firstbeat Technologies Indirect EPOC Prediction Method Based on Heart Rate Measurement. White paper by Firstbeat Technologies Ltd. (2012).
20. Firstbeat Technologies Ltd. Stress and Recovery Analysis Method Based on 24-hour Heart Rate Variability. (2014).
21. Айвазян С. А. Прикладная статистика. Основы моделирования и первичная обработка данных / С. А. Айвазян, И. С. Енюков, Л. Д. Мешалкин. – М.: Финансы и статистика, 1983. – 286 с

INFORMATIVENESS OF INDICATORS CHARACTERIZING THE VEGETATIVE STATUS OF AN ATHLETE IN MUSCULAR ACTIVITY

*Petrushkina N. P.¹, Kolomiets O. I.¹, Latyushin Y. V.¹, Vorovsky S. N.²,
Zvyagina E. V.¹*

¹*Ural State University of Physical Culture, Chelyabinsk, Russia*

²*V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Crimea, Russia*

E-mail: dokchel@mail.ru

The aim of the study was to assess the information content of the indicators of the vegetative status of athletes, characterizing the state of the athlete and the occurrence of "overtraining" during muscle activity.

The main group included 16 athletes whose stress time during sleep exceeded the reference values; in 16 athletes of the control group, it fit within the normal range. There were no other classically recognizable signs of overtraining (decreased athletic performance, complaints of poor health, impaired motor coordination, etc.) in athletes of both groups. Using the Firstbeat monitoring during sleep (480 minutes), we studied the features of autonomic regulation by such indicators as: relaxation time and stress time, indicators of cardiovascular activity and oxygen consumption, and features of energy exchange.

In athletes of both groups, recovery processes prevailed during the sleep period, however, the quality of recovery in the main group was significantly worse than in the control group. The vegetative balance index in the control group of athletes approached unity (1.46 ± 0.04 in the main group and 1.07 ± 0.03 in the control group ($p < 0.05$)). The average heart rate in the study groups during sleep was significantly differed: 61.0 ± 1.5 bpm (in the main) and 57.1 ± 1.3 bpm (in the control) ($p < 0.05$). Higher values of the minimum (49.3 ± 0.9) and maximum heart rate (110.2 ± 3.2) in the main group also indicate a predominance of the tone of the sympathetic nervous system in them, that is, a lower level of recovery than in the control and the appearance of overtraining. post-workout oxygen consumption at rest was, respectively: 0.87 ± 0.07 ml / kg in the main group and 0.59 ± 0.04 ml / kg in the control group ($p < 0.05$). Although metabolic equivalent levels are not significantly differed: in the main – 8.5 ± 0.63 ml / kg / min / 3.5 and 7.8 ± 0.22 – in the control group ($p > 0.05$), the total energy exchange in the main group was almost two times exceeded that in the control group: 603.2 ± 36.13 versus 359.9 ± 16.36 kcal ($p < 0.05$), and energy exchange due to fats was also significantly higher

in the main group of athletes.

Thus, in the Firstbeat monitoring of athletes with a violation of sleep structure as the first sign of a violation of autonomic regulation, significant changes in a number of indicators of visceral functions were recorded. The dynamics and spread of heart rate at rest, the maximum oxygen consumption and post-workout oxygen consumption, the total energy exchange and the ratio of metabolic processes ("carbohydrates: fats"), as well as the recovery index and vegetative balance index, indicate a violation of the recovery processes. We emphasize that this study concerned athletes who did not have clear signs of overtraining (decreased athletic performance, complaints of poor health, impaired subtle motor coordination, etc.). This fact indicates the possibility of using the studied indicators for the early detection of "overtraining" in systematic muscle activity, which will allow not only to adjust the training process, but also to begin timely rehabilitation measures aimed at restoring the athlete.

Keywords: vegetative status, muscle work, athletes, Firstbeat-monitoring, overtraining.

References

1. Baevsky R. M. Problem of the Estimation and Forecasting of the Organisms Functional State and its Development in Space Medicine, *Advances in Physiological Sciences*, **37** (3), 42 (2006).
2. Bykov E. V., Balberova O. V., Chipyshev A. V., Kolomiets O. I., Oreshkina I. N., Sidorkina E. G., Matyukhov D. M. and Lekontsev E. V. Functional Diagnostics With The Use Of Modern Information Technologies in The Management Of The Training Process Of Athletes, *In the collection: "Actual issues of rehabilitation, therapeutic and adaptive physical education and sports medicine." Proceedings of the Russian scientific-practical conference*, 45 (2018).
3. Vrublevsky E. P. and Kostjuchenko V. F. Morphological And Functional Aspects Of Selection And Training Sportswomen In High-Speed And Power Kinds Of Track And Field Athletics, *Uchenye zapiski universiteta imeni P.F. Lesgafta*, 4 (50), 33 (2009).
4. Kostjuchenko V. F. and Vrublevsky E. P. Peculiarities of individual training activity of topclass sportswomen in all-the-round training, *Uchenye zapiski universiteta imeni P. F. Lesgafta*, 3 (49), 39 (2009).
5. Taymazov V. A. and Golub Y. V. *Psychophysiological state of the athlete (Methods of assessment and correction): prakt. Leadership*, 400 p. (St. Petersburg: Olympus, 2004).
6. Vasilets V. V., Kostjuchenko V. F. and Vrublevsky E. P. Comparative analysis of changes of componential structure of the body under the influence of training loading of health-improving character, *Uchenye zapiski universiteta imeni P. F. Lesgafta*, 1 (119), 48 (2015).
7. Kolomiets O. I., Bykov E. V. and Petrushkina N. P. Synchronized Musical Impact As Recovery Aid For Sportsmen (Marital Arts), *The Russian Journal of Physical Education and Sport*, **12** (1), 167 (2017).
8. Kolomiets O. I., Petrushkina N. P. and Bykov E. V. Features of metabolic adaptive changes in various physical activities, *THE SCIENCE. INNOVATION. TECHNOLOGIES*, 1, 207 (2017).
9. Kolomiets O. I., Petrushkina N. P. and Bykov E. V. Psycho-functional state of athletes with an acyclic orientation of the training process, *Appendix of the international scientific journal "Bulletin of Psychophysiology"*, 1, 72 (2018).
10. Kolomiets O. I., Petrushkina N. P. and Bykov E. V. The quality of the recovery process of athletes after aerobic exercise and after the flight, *Journal of restorative medicine & rehabilitation*, 2, 124 (2018).
11. Kolomiets O. I., Bykov E. V. and Petrushkina N. P. Sportsmen's Recovery Quality Analysis On Firstbeat Monitoring Basis (Heart Rate Variability), *Scientific and sport bulletin of Ural and Siberia*, **3** (23), 3 (2019).
12. Kolomiets O. I., Bykov E. V. and Petrushkina N. P. *Modern technologies for analyzing the quality of the training and recovery process of athletes. Methodical guidance*, 50 p. (Chelyabinsk, 2019).

13. Shepilov A. O., Nenasheva A. V., Shevtsov A. V., Latyushin Yu. V. and Izarovskaia I. V. Control of morphofunctional and metabolic state in young swimmers, *Human. Sport. Medicine*, **18** (1), 60 (2018). DOI: 10.14529/hsm180105
14. Kharina I. F., Zvjagina E. V., Bykov E. V. and Makunina O. A. Psychophysiological characteristics of students with the symptoms of attention deficit disorder under the conditions of combined mental and physical loads, *Novosibirsk State Pedagogical University Bulletin*, **8** (3), 181 (2018). DOI: 10.15293/2226-3365.1803.13
15. Nikulin B. A. Clinical and laboratory parameters in the system of biomedical control of athletes. Sports medicine: national leadership (M.: GEOTAR-Media), p. 281–313 (2012).
16. Bykov E. V., Kolomiyets O. I., Petrushkina N. P. and Simonova N. A. Methodological approaches during scientific research works organization in the sphere of physical culture and sport, *The Russian Journal of Physical Education and Sport*, **14** (1), 176 (2019).
17. Brosschot J. F., Geurts S. A., Kruizinga I., Radstaak M., Verkuil B., Quirin M. and Kompier M. A. Does unconscious stress play a role in prolonged cardiovascular stress recovery? *Stress Health*, **30**(3), 179 (2014). doi: 10.1002/smi.2590.
18. Chouchou F. & Desseilles M. Heart rate variability: a tool to explore the sleeping brain? *Front Neurosci*, **8**, 402 (2014) doi:10.3389/fnins.2014.00402. <https://dx.doi.org/10.3389/fnins.2014.00402>.
19. Firstbeat Technologies Indirect EPOC Prediction Method Based on Heart Rate Measurement. White paper by Firstbeat Technologies Ltd. (2012).
20. Firstbeat Technologies Ltd. Stress and Recovery Analysis Method Based on 24-hour Heart Rate Variability. (2014).
21. Ayvazyan S. A., Enyukov I. S. and Meshalkin L. D. *Applied statistics. Fundamentals of modeling and primary data processing*, p. 286. (Moscow: Finance and Statistics, 1983).

УДК 581.5

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ФИТОЦЕНОЗОВ *PINUS PALLASIANA* D. DON НИКИТСКОГО ХРЕБТА

Плугатарь Ю. В., Коба В. П., Панельбу В. В.

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Никитский ботанический сад – Национальный научный центр», пгт. Никита, Ялта, Республика Крым, Россия
E-mail: Serb_84@mail.ru*

Проведено изучение состояния крымскососновых естественных сообществ в районе Никитского хребта, выделены и описаны показатели трансформации лесных фитоценозов, дана характеристика экоморф флоры. Установлено, что в травяном ярусе насаждений *Pinus pallasiana* D. Don в экологическом ряду гидроморф доминируют мезоксерофиты, с повышением высоты над уровнем моря увеличивается представленность мезофитов. В ряду светового режима травяной ярус характеризуется как сциогелиофит.

Ключевые слова: сосновый фитоценоз, травянистые растения, экоморфы, жизненные формы.

ВВЕДЕНИЕ

Сохранение видового разнообразия лесных сообществ является одной из важнейших задач современного этапа формирования системы эффективного управления лесными ресурсами в решении проблем сбалансированного природопользования. Среди задач повышения эффективности природоохранной деятельности и поддержания видового разнообразия приоритетными являются сохранение и восстановление лесов, увеличение их производительности, устойчивости, улучшение качественного состава лесов, оптимизация лесистости территории.

Изучение флористического состава, специфики фитоценологических связей в лесных сообществах Горного Крыма позволяет оценить современное состояние и динамику видовой структуры и состава в решении задач формирования эффективных методов поддержания видового разнообразия экосистем горных ландшафтов региона. Расширение научных изысканий в данном направлении имеет также большое значение для выявления экологических аналогов видов местной флоры, которые можно использовать в Крыму при оптимизации ландшафтов.

На территории полуострова произрастает 13 видов рода *Pinus* L. [1]. Леса *Pinus pallasiana* D. Don наиболее распространены на южном макросклоне Главной гряды Крымских гор и являются северной частью ее природного ареала [2]. Общая площадь лесных насаждений *P. pallasiana* в Крыму составляет 41950,2 га [1]. По данным Ю. К. Подгорного, природные леса *P. pallasiana* в Горном Крыму имеют сложную популяционную структуру, что определяется динамикой процессов

репродукции в связи с высотной поясностью растительных сообществ горных территорий [3].

Целью исследований являлось изучение структуры и состава фитоценозов *P. pallasiana* центральной части южного макросклона Главной гряды Крымских гор, описание и характеристика экоморф флоры в связи с динамикой условий произрастания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили в естественных насаждениях *P. pallasiana* центральной части южного макросклона Главной гряды Крымских гор. Измерение диаметров деревьев проводили мерной вилкой на высоте 1,3 м от основания ствола по элементу леса, по ступеням толщины. В каждой ступени толщины с помощью высотомера «Criterion RD 1000» измеряли высоту. Полученные данные выравнивались графически и использовались для определения разрядов высот по ступеням толщины. Возраст растений определяли согласно методике [1].

Изучение структуры и состава фитоценозов осуществляли согласно методическим рекомендациям геоботанического изучения и классификации растительности Крыма [4]. Анализ экоморф проводили в соответствии с классификацией, разработанной В. Н. Голубевым [5]. Для оценки обилия видов использовалась модифицированная шкала Браун-Бланке: «г» – встречается редко (менее 1%); «+» – незначительное участие ценопопуляции вида в фитоценозе; «1» – проективное покрытие 5–10 %; «2» – от 10 % до 25 %; «3» – от 25 % до 50 %; «4» – от 50 % до 75 %; «5» – более 75 % [6]. Типы эколого-фитоценотической стратегии определяли по методу Раменского-Грайма [7]. Географические координаты площадок проведения наблюдений определяли с помощью навигатора Garmin Oregon 650.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ особенностей структуры и состава, геоботанического обследования травяного яруса в фитоценозах *P. pallasiana* проводили в естественных древостоях на склоне Никитского хребта в различных высотных поясах произрастания.

Пробные площади размером 0,25 га закладывали в трех высотных поясах. В нижнем поясе произрастания на границе с дубовошибляковыми сообществами на высоте 300 м над уровнем моря. В среднем поясе, в зоне оптимума произрастания лесов *P. pallasiana* на южном макросклоне Главной гряды Крымских гор, на высоте 600 м над уровнем моря. В верхней части массива на высоте 900 м над уровнем моря. На пробных площадях (ПП) проводили сплошной пересчет деревьев с оценкой их таксационных показателей. ПП «300» в центральной своей части имеет координаты N44°31'12.55" E34°14'16.04". ПП «600» – N44°31'40.27" E34°14'06.56". ПП «900» – N44°32'04.0" E34°13'34.9".

Таксационные характеристики насаждений *P. pallasiana* в различных высотных поясах в основном отражают особенности высотной динамики условий произрастания (рис. 1 и 2).

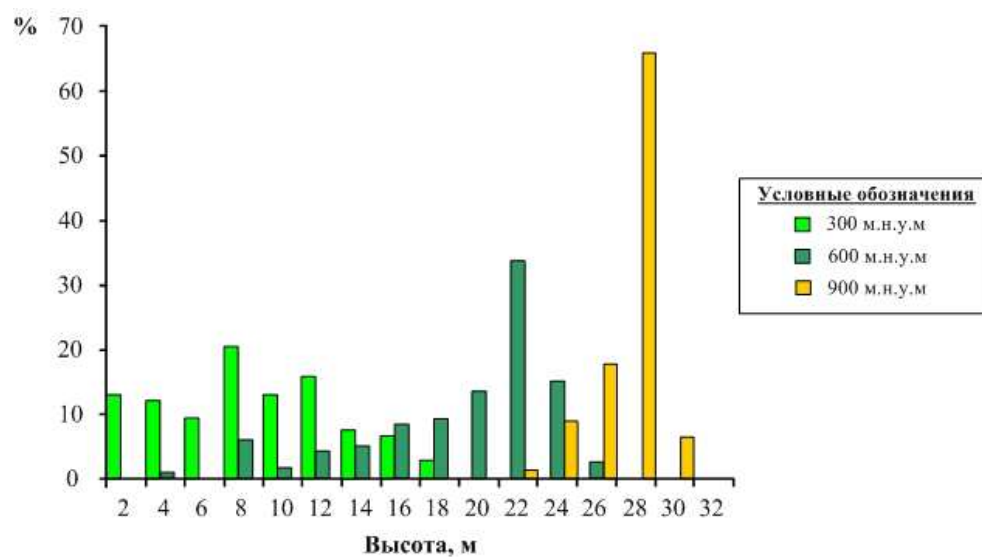


Рис. 1. Распределение деревьев *Pinus pallasiana* D. Don по высоте ствола

В нижнем поясе преобладают растения небольшой высоты и с малым диаметром ствола, средние показатели $8,2 \pm 0,8$ м и $15,8 \pm 1,4$ см, соответственно.

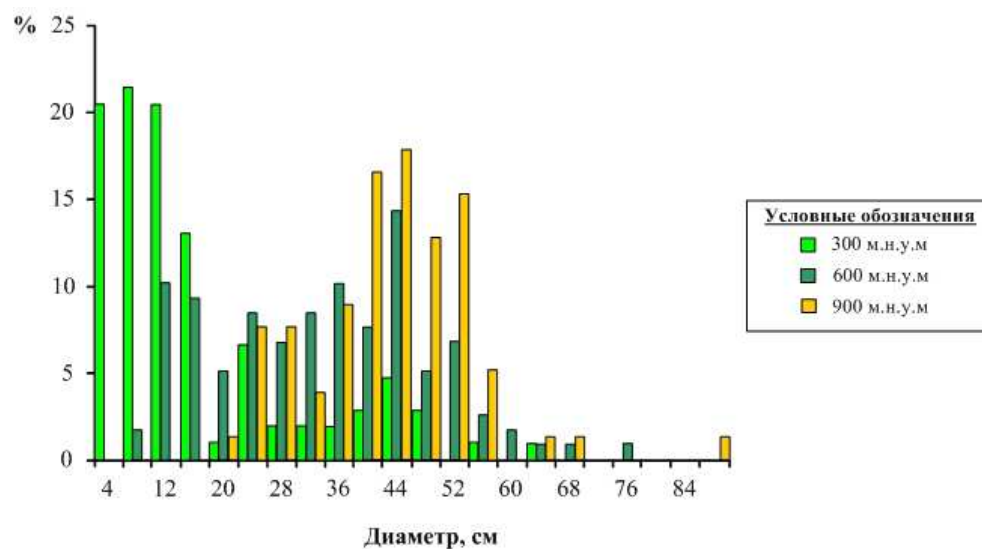


Рис. 2. Распределение *Pinus pallasiana* D. Don по ступеням толщины

Наиболее значительные дендрометрические характеристики имеют древостои верхнего пояса произрастания, здесь средняя высота деревьев *P. pallasiana* составила $26,7 \pm 2,3$ м, диаметр $41,6 \pm 3,8$ см.

Оценка возрастной структуры изучаемых насаждений показала (рис 3), что в нижнем поясе в составе древостоев преобладают деревья *P. pallasiana* первых возрастных групп, средний возраст которых составил $53,9 \pm 0,5$ лет.

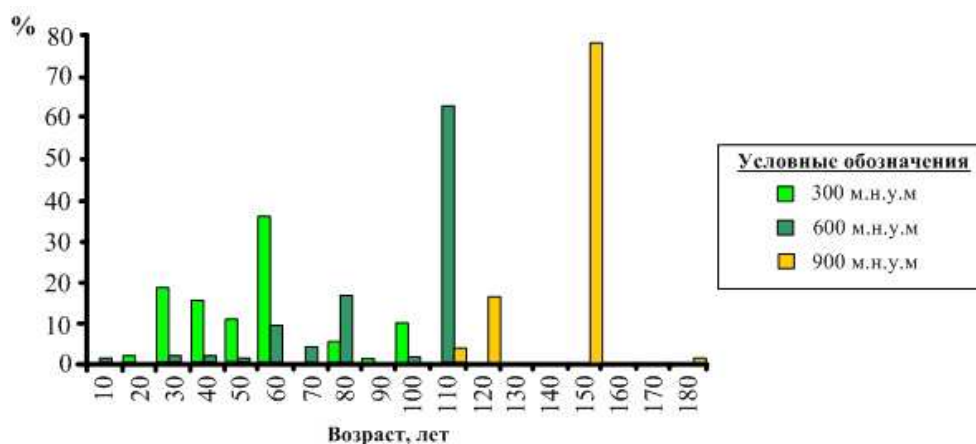


Рис. 3. Возрастная структура древостоев *Pinus pallasiana* D. Don

На высоте 600 м над уровнем моря данный показатель был почти в два раза выше – $94,5 \pm 0,8$ лет. В верхнем поясе средний возраст более значительно увеличился и составил $143,9 \pm 1,2$ лет. При этом данные насаждения представлены только тремя возрастными группами: 110, 120 и 150 лет. Представители великовозрастной группы преобладают в составе древостоя, это свидетельствует о том, что формирование древостоев *P. pallasiana* в верхнем поясе Никитского хребта определялось сукцессионными процессами, изначально связанных с гибелью коренных насаждений в результате воздействия тех или иных катастрофических явлений [8].

В лесах Горного Крыма с наибольшей вероятностью это может быть связано с действием верховых пожаров. Известно, что во второй половине XIX в. в лесах над г. Ялта в районе Никитского хребта произошло два крупных пожара, охвативших территорию более 2 тыс. га. Таким образом, действие верховых пожаров определяет сужение возрастных спектров природных популяций *P. pallasiana* и способствует формированию практически одновозрастных насаждений. Вероятность крупных пожаров в верхнем поясе увеличивается в результате увеличения крутизны склонов, что повышает возможности перехода низового огня в кроны деревьев [3]. При маршрутном обследовании насаждений *P. pallasiana* достаточно часто встречались деревья, поврежденные молнией. Снижение возраста насаждений *P. pallasiana* в нижнем поясе, очевидно, связано с прямым физическим антропогенным воздействием, так как они в наибольшей степени приближены к селитебным территориям.

На профиле были заложены временные пробные площадки для фитоценотического изучения травянистой растительности в сосновом фитоценозе

(табл. 1). В пределах высот над уровнем моря 300 м до 600 м отмечено 20 видов растений травяного яруса, с повышением высоты от 600 м до 900 м количество видов травяного яруса увеличивается до 60 видов.

Таблица 1

Представленность видов различных семейств в фитоценозах *P. pallasiana* в районе проведения исследований

№	Семейство	Высота над уровнем моря			
		300–600 м.		600–900 м.	
		Количество видов, шт	%	Количество видов, шт	%
1	<i>Apiaceae</i>	3	15	4	7
2	<i>Asteraceae</i>	1	5	8	13
3	<i>Araceae</i>	1	5	0	0
4	<i>Asphodelaceae</i>	0	0	1	2
5	<i>Boraginaceae</i>	1	5	2	3
6	<i>Caryophyllaceae</i>	0	0	1	2
7	<i>Cyperaceae</i>	2	10	1	2
8	<i>Convallariaceae</i>	1	5	2	3
9	<i>Dipsacaceae</i>	0	0	1	2
10	<i>Euphorbiaceae</i>	1	5	2	3
11	<i>Ericaceae</i>	0	0	4	7
12	<i>Fabaceae</i>	0	0	1	2
13	<i>Geraniaceae</i>	0	0	1	2
14	<i>Hyacinthaceae</i>	0	0	1	2
15	<i>Iridaceae</i>	1	5	2	3
16	<i>Lamiaceae</i>	2	10	7	12
17	<i>Leguminosae</i>	0	0	2	3
18	<i>Melanthiaceae</i>	0	0	1	2
19	<i>Onagraceae</i>	0	0	1	2
20	<i>Orchidaceae</i>	0	0	1	2
21	<i>Paeoniaceae</i>	1	5	1	2
22	<i>Primulaceae</i>	0	0	1	2
23	<i>Poaceae</i>	2	12	5	8
24	<i>Rosaceae</i>	0	0	3	5
25	<i>Rubiaceae</i>	1	5	2	3
26	<i>Rutaceae</i>	1	5	0	0
27	<i>Scrophulariaceae</i>	0	0	4	7
28	<i>Violaceae</i>	2	10	1	2
Σ		20	100	60	100

На высотах 300–600 м.н.у.м. виды травяного яруса относятся к 14 семействам, с повышением высоты число семейств, вследствие увеличения числа видов, увеличивается до 26 семейств. Следует отметить, что с повышением высоты из напочвенного покрова исчезают виды семейства *Araceae* и *Rutaceae*.

Экологические группы растений напочвенного покрова, объединяющие виды со сходными характеристиками толерантности к различным экологическим факторам (экоморфы), в связи с уровнем увлажнения (табл. 2) и освещенности (табл. 3).

Таблица 2

Экологический спектр видов в зависимости от увлажнения субстрата в фитоценозах *P. pallasiana* на склоне Никитского хребта

Экологическая характеристика	В.Н.У.М.			
	300–600 м.		600–900 м.	
	Количество видов, шт	%	Количество видов, шт	%
ксеромезофит	1,0	5,0	3,0	5,0
мезоксерофит	10,0	50,0	20,0	33,3
мезофит	9,0	45,0	37,0	61,7
Σ	20,0	100,0	60,0	100,0

По результатам проведенных исследований выявлены 3 экологические группы по отношению к увлажнению субстрата. Эуксерофиты и гигрофиты не наблюдались. Анализ экологических групп растений по отношению к влажности почвы показал, что в насаждениях *P. pallasiana* в экотопах Никитского хребта на высоте 300–600 м над уровнем моря преобладают мезоксерофиты, с увеличением высоты местопроизрастания доминантное положение занимают виды растений, приспособленные к жизни в среде с умеренной влажностью почвы и воздуха. Большая доля мезофитов среди выявленных видов можно объяснить фитоценотической приуроченностью большей части растений травянистого яруса к сообществам мезофильных и мезоксерофильных лесов.

Таблица 3

Характеристика растений травяного яруса в фитоценозах *P. pallasiana* на склоне Никитского хребта по отношению к свету

Экологическая характеристика	В.Н.У.М.			
	300–600 м.		600–900 м.	
	Количество видов, шт	%	Количество видов, шт	%
гелиофит	2,0	10,0	10,0	16,7
сциогелиофит	7,0	35,0	18,0	30,0
гелиосциофит	5,0	25,0	17,0	28,3
сциофит	6,0	30,0	15,0	25,0
Σ	20,0	100,0	60,0	100,0

По отношению к световому режиму в сосновом сообществе (табл. 3) наибольшее представительство имеют теневыносливые растения, обладающие высокой пластичностью по отношению к свету.

С повышением высоты над уровнем моря прослеживается тенденция к увеличению доли видов открытых, постоянно хорошо освещаемых местообитаний (гелиофиты) и промежуточной группы видов, хорошо растущих на ярком свету, и выдерживающих затенение (гелиосциофиты). В верхнем поясе доля тенелюбивых видов (сциофитов) снижается.

В лесных сообществах *P. pallasiana* Никитского хребта отмечено преобладание аэропедофитов, что характерно для большинства видов флоры Крыма.

Общий анализ результатов исследований, позволяет оценить эколого-ценотическую стратегию фитоценоза *P. pallasiana* как конкурентно – стресс-толерантно – рудеральную (таблица 4).

С повышением высоты над уровнем моря наблюдается увеличение доли виолентов в травяном ярусе, а также отсутствие вторичного типа стратегии конкурентно – рудерального. Прослеживается некоторое увеличение видов конкурентно – стресс-толерантного типа стратегии, что свидетельствует об усилении действия лимитирующих факторов с повышением высоты над уровнем моря.

Таблица 4

**Эколого-ценотическая стратегия *P. Pallasiana* массива лесов
Никитского хребта**

Типы эколого-ценотической стратегии	В.Н.У.М.	
	300–600 м.	600–900 м.
	%	%
С	15,4	23,8
CR	7,7	0,0
CS	23,1	28,6
CSR	53,8	47,6
Σ	100,0	100,0

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таксационные характеристики насаждений *P. pallasiana* в различных высотных поясах отражают особенности высотной динамики условий произрастания. В нижнем поясе преобладают растения небольшой высоты и малого диаметра ствола. Наиболее высокими дендрометрическими показателями характеризуются древостои верхнего пояса.

Антропогенное воздействие, как в прошлом, так и в настоящее время оказывает значительное влияние на структуру и состав древостоев *P. pallasiana* южного макросклона Главной гряды Крымских гор. В нижнем поясе это определяется прямым физическим воздействием, а в верхнем – прохождением сильных пожаров.

В травяном ярусе фитоценозов *P. pallasiana* нижнего пояса в экологическом ряду гидроморф преобладают мезоксерофиты, с повышением высоты над уровнем моря увеличивается доля мезофитов. В ряду светового режима доминируют сциогелиофиты, вне зависимости от высоты местопроизрастания.

С повышением высоты местопроизрастания наблюдается тенденция увеличения доли видов открытых, постоянно освещаемых местообитаний и промежуточной группы видов, хорошо растущих на ярком свету.

Эколого-ценотическая стратегия фитоценоза *P. pallasiana* Никитского хребта имеет вторичный конкурентно – стресс-толерантно – рудеральный спектр вне зависимости от высоты над уровнем моря.

Список литературы

1. Плугатарь Ю. В. Леса Крыма: монография. / Плугатарь Ю. В. – Симферополь: ИТ «АРИАЛ», 2015. – 368 с.
2. Дидух Я. П. Сосновые леса Горного Крыма / Я. П. Дидух // Ботанический журнал. – 1990. – Т. 75. – С. 336–346.
3. Подгорный Ю. К. Закономерности формирования популяционной структуры горных растений и пути их использования в интродукции, селекции, охране генофондов (на примере сосны крымской). Автореф. дисс... доктора биол. наук. / Подгорный Ю. К. – М., 1995. – 52 с.
4. Методические рекомендации по геоботаническому изучению и классификации растительности Крыма. ГНБС: Сост. В. Н. Голубев, В. В. Корженевский. – Ялта, 1985. – 48 с.
5. Голубев В. Н. Биологическая флора Крыма. / Голубев В. Н. – Ялта: НБС-ННЦ, 1996. – 2-е изд. – 126 с.
6. Westhoff V. The Braun-Blanquet approach / Westhoff V., Maarel E. van der. // Classification of plant communities. The Hague. – 1978. – P. 287–399.
7. Раменский Л. Г. О принципиальных установках, основных понятиях и терминах производственной типологии земель / Раменский Л. Г. // Современная ботаника. – 1935. – №4. – С. 25–42.
8. Коба В. П. Некоторые особенности внутривидовой дифференциации *Pinus pallasiana* в связи с пирогенной адаптацией / В. П. Коба // Экосистемы, их оптимизация и охрана. – 2011. – Вып. 5. – С. 47–51.

SOME FEATURES OF THE ECOLOGICAL STRUCTURE OF PHYTOCENOSIS PINUS PALLASIANA D. DON NIKITA RIDGE

Plugatar Yu. V., Koba V. P., Papelbu V. V.

*Federal State-Funded Institution of Science «The Nikitsky Botanical Gardens – National Scientific center», Nikita, Yalta, Russian Federation
E-mail: Serb_84@mail.ru*

The study of the state of the Crimean pine natural communities in the area of the Nikitsky ridge has been conducted, the indicators of transformation of forest phytocenoses have been identified and described, the characteristic of flora ecomorphs has been given.

It has been found that the taxational characteristics of *Pinus pallasiana* D. Don plantations in different high-altitude belts reflect the features of the high-altitude dynamics of growing conditions. The lower belt is dominated by plants of small height and small

trunk diameter. The stands of the upper belt are characterized by the highest dendrometric indicators.

In the grass tier of *P. pallasiana* stands mesoxerophytes dominate in the ecological range of hydromorphs. With increasing altitude, the representation of mesophytes increases. In the range of light regime grass tier is characterized as shade-enduring.

Anthropogenic influence has a significant impact on the structure and composition of *P. pallasiana* stands of the southern macroslope of the Main ridge of the Crimean mountains. In the lower zone, this is determined by direct physical impact, and in the upper zone, by the passage of strong fires.

In forest communities of *P. pallasiana* of the Nikitsky ridge, prevalence of aerophedophytes was noted, which is typical for most species of the Crimean flora.

The ecological-cenotic strategy of *P. pallasiana* phytocenoses of the Nikitsky ridge has a secondary competitive-stress-tolerant-ruderal spectrum regardless of above sea level altitude. With an increase in altitude, there is an increase in the proportion of violents in the grass layer, as well as the absence of a secondary type of competitive-ruderal strategy. There is a slight increase in the types of competitive-stress-tolerant type of strategy, which indicates an increase in the action of limiting factors with an increase in altitude.

Keywords: pine phytocenosis; herbaceous plants; ecomorphs, life forms.

References

1. Plugatar' Yu. V. *Forests of Crimea: a monograph*, 368 p (Simferopol: IT «ARIAL», 2015).
2. Didukh Ya. P. Pine forests of the Crimean Mountains, *Botanical Journal*, **75**, 336 (1990).
3. Podgornyy Yu. K. *Patterns of formation of the population structure of mountain plants and ways of their use in the introduction, selection, protection of gene pools (for example, Crimean pine)*, Abstract. diss... doctor biol. Sciences, 52 p (M., 1995).
4. Guidelines for the geobotanical study and classification of Crimean vegetation. GNBS: V. N. Golubev, V. V. Korzhenevskiy, 48 p (Yalta, 1985).
5. Golubev V. N. *Biological flora of Crimea*, 2nd ed., 126 p (Yalta: NBS-NSC, 1996).
6. Westhoff V., Maarel E. van der. The Braun-Blanquet approach, *Classification of plant communities*, 287 (1978).
7. Ramensky L. G. On the fundamental principles, basic concepts and terms of the production typology of land, *Modern Botany*, **4**, 25 (1935).
8. Koba V. P. Some features of the intrapopulation differentiation of *Pinus pallasiana* in connection with pyrogenic adaptation, *Ecosystems, their optimization and protection*, **5**, 47 (2011).

УДК 582.28 (476)

**ФИТОТРОФНЫЕ ОБЛИГАТНО-ПАРАЗИТНЫЕ МИКРОМИЦЕТЫ
ЦЕЛИННОГО СТЕПНОГО УЧАСТКА ОКРЕСТНОСТЕЙ С. ЯСТРЕБКИ
НИЖНЕГОРСКОГО РАЙОНА РЕСПУБЛИКИ КРЫМ**

Просянкина И. Б., Кадочникова В. И.

*Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», Симферополь, Республика Крым, Россия
E-mail: aphanisomenon@mail.ru*

В результате проведенных исследований на территории целинного степного участка окрестностей с. Ястребки Нижнегорского района (Республика Крым, Россия) нами обнаружены 24 вида из 9 родов 7 семейств, 7 порядков и 7 классов, принадлежащих к 3 отделам грибов и грибоподобных организмов. Фитотрофные микромицеты зафиксированы на 24 видах питающих растений из 13 семейств, 13 порядков, двух классов и одного отдела высших растений 13 семейств покрытосеменных растений, причем наибольшее количество видов грибов приходится на семейства Poaceae и Asteraceae (10 видов), что составляет 40 % от общего количества видов грибов-паразитов.

Ключевые слова: фитотрофная паразитная микобиота, аннотированный список, целинный степной участок, Степной Крым.

ВВЕДЕНИЕ

Природная растительность Крымского полуострова очень богата в видовом отношении и чрезвычайно разнообразна по типам растительных сообществ. В частности, флора Крыма насчитывает 2536 видов и подвидов из 760 родов, 127 семейств и 5 отделов [1]. В Крыму можно обнаружить как типичные зональные степи, лесные фитоценозы, так и аazonальные группировки: луговые, галофитные и псаммофитные фитоценозы [2]. В связи с этим изучение видового состава грибов-паразитов растений является актуальным, особенно в регионах, которые еще недостаточно изучены в микологическом отношении. Одним из таких районов является Степная зона Крыма.

Крымская степь – это регион, соответствующий Крымскому степному и Керченскому геоботаническим округам зоны причерноморских степей. На юге он граничит с Крымским предгорьем (граница проходит по линии русла реки Альма-Кольчугино–Гвардейское – севернее Новожиловки–Озерное–Приветное – севернее Феодосии). В доаграрный период здесь преобладали бедно-разнотравные кострцово-ковылевые, полынно-злаковые степные фитоценозы, кустарниковые и петрофитные варианты кострцово-ковылевых степей [2].

В Крымской степи есть ряд территорий, для которых характерен высокий уровень как фиторазнообразия, так и эндемизма растений. Это относится, в первую очередь, к Тарханкутскому полуострову, мысу Казантип и южной части

Керченского полуострова. В вышеуказанных местах уже созданы Казантипский и Опукский заповедники, Караларский региональный ландшафтный парк и Тарханкутский национальный парк (Волшебная гавань). Рельеф, климат, разнообразие сосудистых растений и значительный набор экотопов Степного Крыма создают благоприятные условия для развития как самих растений, так и трофически тесно связанных с ними грибов-паразитов [2]. В связи с этим, в результате тщательного изучения список облигатных паразитов и питающих растений для Степного Крыма может быть расширен. Изучение паразитической микобиоты, консортивно связанной с растениями целинного степного участка в окрестностях с. Ястребки Нижнегорского района Республики Крым (рис. 1) в микологическом отношении представляет интерес и ранее никогда не изучалось.

Целью работы явилось изучение видового состава фитотрофных облигатно-паразитных микромицетов целинного степного участка, расположенного в окрестностях села Ястребки Нижнегорского района Республики Крым.



Рис. 1. Картосхема целинного степного участка в окрестностях с. Ястребки Нижнегорского района Республики Крым [<https://www.google.ru/maps>].

Примечательным является тот факт, что в поселке ранее был отмечен географический центр Крыма и во времена СССР в центре поселка Ястребки была установлена стела с указанием данного географического центра. На рисунке 2 представлено разнообразие особенностей микрорельефа целинного степного участка в окрестностях с. Ястребки, которое имеет вид плоской или слабоволнистой равнины с выходами каменистых обнажений, местами с небольшими балками глубиной от 0,5 до 2,5 м с сильно защебненной почвой.

В разреженном травостое целинного участка преобладают ковыль Лессинга (*Stipa lessingiana* Trin. & Rupr.), бородач кровоостанавливающий *Botriochloa ischaemum* (L.) Keng, типчак (*Festuca valesiaca* Schleich. ex Gaudin), тонконог гребенчатый (*Koeleria pyramidata* (Lam.) P.Beauv.), иногда обнаруживается трагус кистистый (*Tragus racemosus* (L.) All.), цинанхум острый (*Cynanchum acutum* L.), зерна береговая, или костерц береговой (*Bromus riparius* Rehmman), но при этом постоянно встречаются полукустарнички — чабрец крымский (*Thymus tauricus*

Klokov & Des.-Shost.) и косматый (*Thymus roegneri* (K. Koch) C.Kochи); дубровники белый (*Teucrium polium* L.) и обыкновенный (*Teucrium chamaedrys* L.); бурачок туполистный (*Alyssum obtusifolium* Steven ex DC.) (рис. 3А), дрок скифский (*Genista scythica* Pacz.), оносма жесткая (*Onosma rigidum* Ledeb.) (рис. 3Б), солнцеветы седой (*Helianthemum oelandicum subsp. incanum* (Willk.) G.López) и монетолистный (*Helianthemum nummularium* (L.) Mill.) и др.



Рис. 2. Особенности микрорельефа целинного степного участка окрестностей села Ястребки Нижегородского района Республики Крым (фото автора).

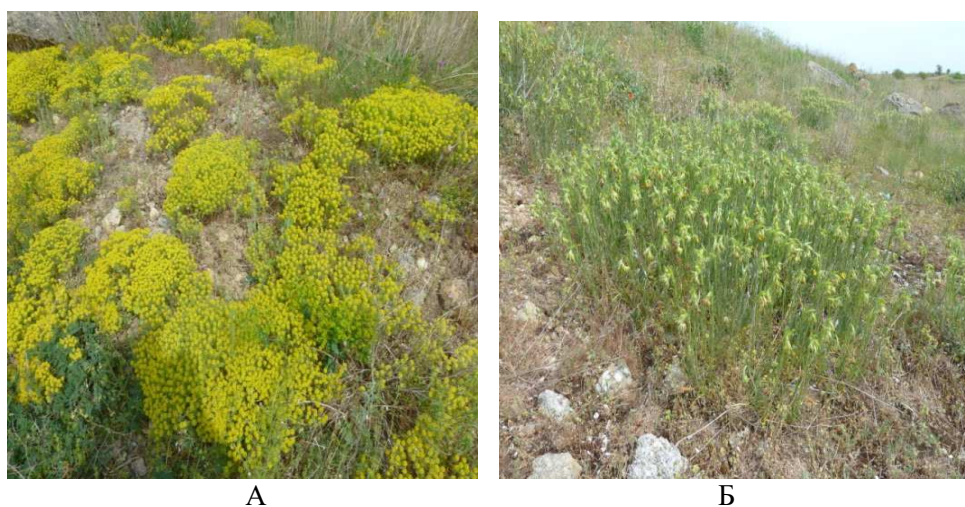


Рис. 3. Участок петрофитной степи в окрестностях села Ястребки с разреженным травостоем: А – куртины *Alyssum obtusifolium* Stev. Et DC.; Б – *Onosma rigidum* Ledeb. (фото автора).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор образцов облигатных паразитов высших растений производился в течение вегетационных сезонов (апрель–октябрь) 2017–2018 гг. маршрутным методом на территории вышеуказанного участка целинной степи в окрестностях с. Ястребки Нижнегорского района Республики Крым. Больные растения или их части гербаризировали с составлением стандартных этикеток [3]. Материал исследовали методом световой микроскопии с помощью микроскопов МБС-10 и Микмед-5. Видовую идентификацию фитопатогенов проводили с использованием отечественных, зарубежных определителей и справочной литературы [4–11]. Таксономический статус видов грибов и грибоподобных организмов приведен согласно базам «Mycobank» и «Index Fungorum» [12, 13]; видовые названия и таксономическое положение растений-хозяев представлены в соответствии со сводкой «The Plant List» [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Список видов фитотрофных микромицетов, зафиксированных на территории целинного степного участка окрестностей с. Ястребки в 2017–2018 гг., приводится ниже в аннотированном списке видов грибов и грибоподобных организмов с указанием их обилия по шкале Гааса [15] (индекс указан в скобках). Шкала встречаемости или обилия вида Гааса представлена в баллах: + – только в одном месте; 1 – единично; 2 – очень рассеянно; 3 – неравномерно рассеянно; 4 – во многих местах; 5 – всюду часто.

Отдел Oomycota, класс Oomycetes, порядок Peronosporales, семейство Albuginaceae

Albugo candida (Pers. ex J.F. Gmel.) Roussel (+) на *Alyssum obtusifolium* Steven ex DC. листья, 07. 05. 2017 (рис. 5).

Wilsoniana bliti (Biv.) Thines (1) на *Amaranthus retroflexus* L., листья, 23. 09. 2018.

Отдел Ascomycota, класс Leotiomycetes, порядок Erysiphales, семейство Erysiphaceae

Erysiphe aquilegiae DC. (1) на *Thalictrum minus* L., листья, 02. 05. 2017.

Golovinomyces biocellatus (Ehrenb.) V.P. Heluta (1) на *Salvia pratensis* L., листья, 01. 06. 2017.

Класс Leotiomycetes, порядок Helotiales, семейство Sclerotiniaceae

Botrytis cinerea Pers. (+) на *Descurainia sophia* (L.) Webb ex Prantl, листья, стебли, 02. 05. 2018.

Класс Dothideomycetes, порядок Mycosphaerellales, семейство Mycosphaerellaceae

Ramularia ovata Fuckel (1) на *Salvia nutans* L., листья, 07. 05. 2017.

Отдел Basidiomycota, класс Pucciniomycetes, порядок Uredinales, семейство Pucciniaceae

Phragmidium sanguisorbae (DC.) J. Schröt. (3) на *Sanguisorba minor subsp. magnolii* (Spach) Briq., листья, 07. 05. 2017 (рис. 4).

Phragmidium potentillae (Persoon) Karsten на *Potentilla* sp. (4) на *Potentilla taurica* Willd. ex Schldt., листья, 07. 05. 2017; 18. 06. 2017.

Puccinia brachypodii G.H. Otth (1) на *Koeleria macrantha* (Ledeb.) Schult., листья, 01. 06. 2017.

Puccinia caricina DC. (+) на *Carex liparocarpos* Gaudin, листья, 07. 05. 2017.

Puccinia cesatii J. Schröt. (4) на *Bothriochloa ischaetum* (L.) Keng., листья, 29. 07. 2018.

Puccinia chondrillina Bubák & Syd. (2) на *Chondrilla juncea* L., стебель, листья, 23. 09. 2018.

Puccinia cynodontis Lacroix ex Desm. (3) на *Valerianella carinata* Loisel., листья, 07. 05. 2017 (рис. 7); на *Cynodon dactylon* (L.) Pers., листья, 29. 07. 2018.

Puccinia falcariae Fuckel (4) на *Falcaria vulgaris* L., листья, 01. 06. 2017.

Puccinia graminis Pers. (4) на *Elymus repens* (L.) Gould (= *Elytrigia repens* (L.) Nevski), листья, стебли, соцветия, 07. 05. 2017.

Puccinia hieracii (Röhl.) H. Mart. (+) на *Pilosella procera* (Fr.) F.W.Schultz & Sch.Bip.(= *Hieracium procerum* Fr.) , листья, 29. 07. 2018.

Puccinia helianthemi Kravtzev (+) на *Helianthemum stevenii* Rupr. ex Juz. & Pozd., листья, 29. 07. 2018.

Puccinia recondita Roberge ex Desm. (2) на *Thalictrum minus* L., листья, 18. 06. 2017, 29. 07. 2018.

Puccinia tanacetii DC. (= *Puccinia chrysanthemi* Roze) (1) на *Artemisia austriaca* Jacq, листья, 02. 05. 2018.

Uromyces pisi-sativi (Pers.) Liro (= *Uromyces punctatus* J. Schröt) (+) на *Astragalus* sp., листья, бобы, 23. 09. 2018.

Uromyces scutellatus (Schrank) Niessl (4) на *Euphorbia agraria* M. Bieb., листья, 07. 05. 2017.

Uromyces sublevis Tranzschel (3) на *Euphorbia petrophila* C.A. Mey., листья, 02. 05. 2018; на *Euphorbia glareosa* Pall. ex M. Bieb., листья, 23. 09. 2018.

Класс Ustilaginomycetes, порядок Urocystidales, семейство Urocystidaceae

Sporisorium andropogonis (Opiz) Vánky (2) на *Bothriochloa ischaetum* (L.) Keng, соцветия, 01. 06. 2017, 29. 07. 2018, 23. 09. 2018.

Класс Exobasidiomycetes, порядок Georgefischeriales, семейство Georgefischeriaceae

Jamesdicksonia ischaemiana (Thirum. & Pavgi) R. Bauer, Begerow, A. Nagler & Oberw. (+) на *Bothriochloa ischaetum* (L.) Keng, стебли, листья, 23. 09. 2018 (рис. 6).

Согласно градации шкалы Гааса, ржавчинный гриб *Uromyces scutellatus* (Schrank) Niessl и *Puccinia cesatii* J. Schröt. встречались во многих местах; *Phragmidium sanguisorbae* (DC.) J. Schröt. (рис. 4); *Uromyces sublevis* Tranzschel – неравномерно рассеянно; *Sporisorium andropogonis* (Opiz) Vánky; *Puccinia recondita* Roberge ex Desm. – очень рассеянно, а *Uromyces pisi-sativi* (Pers.) Liro и *Jamesdicksonia ischaemiana* (Thirum. & Pavgi) R. Bauer, Begerow, A. Nagler & Oberw. – единично.

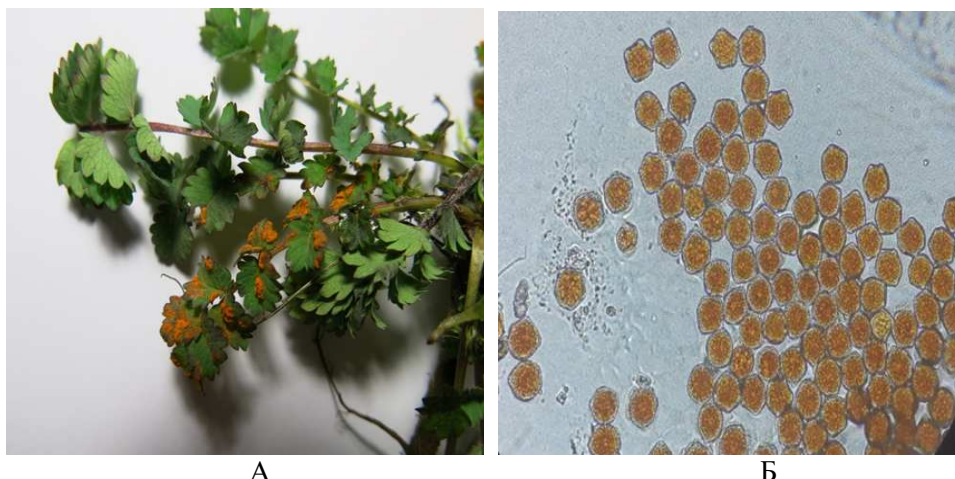


Рис. 4. Ржавчинный гриб *Phragmidium sanguisorbae* (DC.) J. Schröt. на *Sanguisorba minor subsp. magnolii* (Spach) Briq. (Rosaceae): А – поражённые листья; Б – эциоспоры (увел. 400х, ориг.).

Ржавчинный гриб *Uromyces scutellatus* (Pers.) Lév., впервые обнаруженный на *Euphorbia agraria* M.Bieb. (Euphorbiaceae) для Степной зоны Крыма, вызывал у растения-хозяина деформацию побегов, проявляющуюся в задержке роста и угнетении генеративных органов растения-хозяина. Микологический интерес также представляет факт обнаружения на листьях *Thalictrum minus* L. (Ranunculaceae) двух видов облигатно-паразитных микромицетов: мучнисторосяного *Erysiphe aquilegiae* DC. и ржавчинного *Puccinia recondita* Roberge ex Desm. Грибоподобный организм *Albugo candida* Pers. Roussel был обнаружен в Крыму на новом растении-хозяине *Alyssum abtusifolium* Steven ex DC. (Brassicaceae) (рис. 5).

На территории исследуемого целинного участка петрофитной степи впервые был обнаружен новый для Крыма вид головневого гриба *Jamesdicksonia ischaemiana* (Thirum. & Pavgi) R. Bauer, Begerow, A. Nagler & Oberw. (= *Melanotaenium ischaemianum* Thirum. & Pavgi), развивающийся на стебле и листьях *Bothriochloa ischaetum* (L.) Keng (Poaceae). Анализ данных литературы показал, что вышеуказанный гриб на растении-хозяине *Bothriochloa ischaetum* ранее для Крыма отмечен не был [2]. Согласно данным литературы обнаружение другого вида данного рода *Jamesdicksonia festucae* Vánky ранее было зарегистрировано на листьях и стеблях *Festuca tolucensis* Kunth. в Мексике [16, 17]. Известны также находки еще одного вида – *Jamesdicksonia obesa* на листьях и стеблях *Dichanthium annulatum* (Forssk.) Stapf (= *Bothriochloa annulatum* (Forssk.) Stapf) в Южной Азии (Индии) и Южной Америке (Колумбии) [18], а также – *Jamesdicksonia irregularis* (Johanson) R. Bauer, Begerow, A. Nagler & Oberw. на *Poa pratensis* L. в Польше [19].

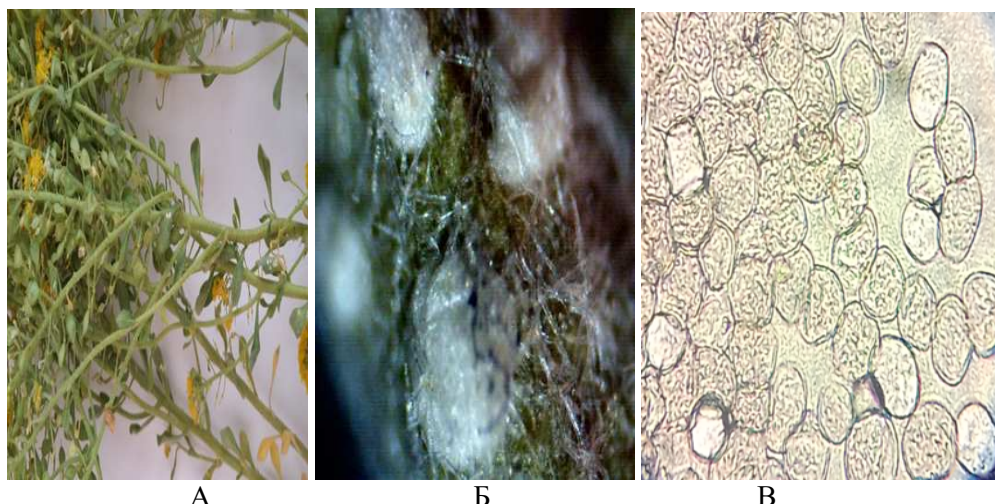


Рис. 5. Оомикет *Albugo candida* Pers. Roussel на *Alyssum abtusifolium* Steven ex DC (Brassicaceae): А – внешний вид пораженного растения; Б – пустулы на листьях (увел. 40х); В – споры (увел. 400х, фото автора).

Таким образом, на одном питающем растении *Bothriochloa ischaemum* (рис. 6) нами обнаружены три вида облигатно-паразитных грибов (два вида головневых гриба, имеющих различные органотропную специализацию – *Sporisorium andropogonis* на соцветиях и *Jamesdicksonia ischaemiana* на стеблях и листьях) и один вид ржавчинного гриба – *Puccinia cesatii*, развивающийся на листьях. Такие находки представляют значительный микологический интерес, поскольку имеют значение для изучения процессов миграции грибов и помогают понять вопросы их ареалогии.

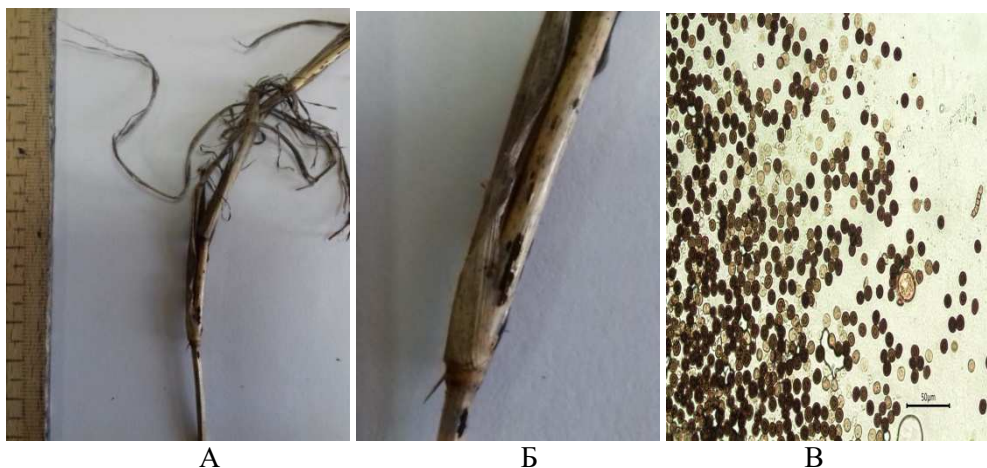


Рис. 6. Головневый гриб *Jamesdicksonia ischaemiana* (Thirum. & Pavgi) R. Bauer, Begerow, A. Nagler & Oberw. на стебле и листьях *Bothriochloa ischaemum* (L.) Keng (Poaceae): А и Б – побег с пустулами гриба; В – устоспоры гриба (увел. 400х, ориг.).

На рис. 7 представлен часто встречающийся в Степном Крыму ржавчинный гриб *Puccinia cynodontis* Lacroix ex Desm. на листьях эфемера *Valerianella carinata* Loisel.

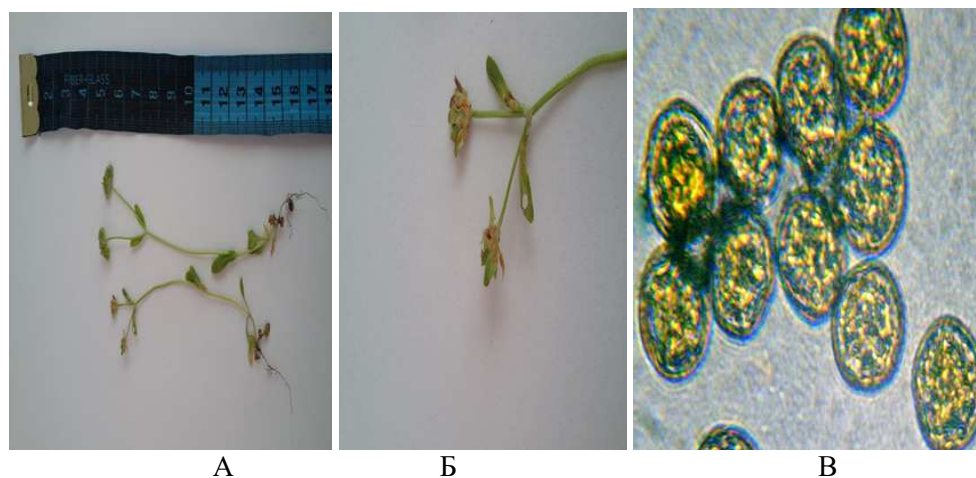


Рис. 7. Ржавчинный гриб *Puccinia cynodontis* Lacroix ex Desm. на листьях *Valerianella carinata* Loisel. (Caprifoliaceae): А – внешний вид пораженного растения-хозяина; Б – фрагмент пораженного грибом соцветия; В – эциоспоры гриба (увел. 400х, ориг.).

Как видно из данных таблицы 1, в результате проведенных исследований видового состава фитотрофных облигатно-паразитных микромицетов целинного степного участка окрестностей села Ястребки Нижнегорского района нами обнаружено 24 вида из 9 родов грибов-паразитов, 7 семейств, 7 порядков и 7 классов, принадлежащих к 3 отделам грибов и грибоподобных организмов (ГРПО). Представители отдела Оомусота (ГРПО) насчитывают 2 рода (22,2 % от общего числа родов) и 2 вида, что составляет 8,3 % от общего количества видов. Второе место по количеству родов и видов занимает отдел Ascomycota; он включает в себя 4 рода (44,4 % от общего количества) и 4 вида (16,7 %) соответственно. Наибольшее количество родов и видов составляет отдел Basidiomycota – 5 родов (55,5 %) и 18 видов (75,0 %), соответственно.

Данные о приуроченности видов облигатно-паразитных грибов к семействам растений-хозяев отражены в таблице 2. Обнаруженные нами грибы-паразиты зарегистрированы на представителях 13 семейств, покрытосеменных растений, преимущественно класса Двудольные – 11 семейств: Brassicaceae, Apiaceae, Amaranthaceae, Lamiaceae, Ranunculaceae, Caprifoliaceae, Rosaceae, Asteraceae, Cistaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae; класс Однодольные – представлен видами из двух семейств: Сурегасеae и Роасеae.

Таблица 1

Количественное распределение таксонов фитотрофных облигатно-паразитных микромицетов целинного степного участка окрестностей с. Ястребки Нижегородского района Республики Крым

№ п/п	Название отдела грибов и грибоподобных организмов	Количество классов	Количество порядков	Количество семейств	Количество родов	Количество видов
1	Oomycota	1	1	1	2	2
2	Ascomycota	3	3	3	4	4
3	Basidiomycota	3	3	3	5	18
	Всего	7	7	7	9	24

Анализируя данные таблицы 2, можно сделать вывод, что в наибольшей степени подвержены поражению грибами-паразитами следующие семейства: Poaceae (7 видов грибов) из класса Однодольные, а из класса Двудольные – Asteraceae (3 вида грибов), Lamiaceae и Euphorbiaceae (по 2 вида соответственно).

Таблица 2

Распределение фитотрофных облигатно–паразитных микромицетов целинного степного участка окрестностей с. Ястребки Нижегородского района Республики Крым по семействам растений-хозяев

№ п/п	Семейство растений-хозяев	Количество видов	
		растений-хозяев	грибов
1.	Amaranthaceae	1	1
2.	Apiaceae	1	1
3.	Asteraceae	3	3
4.	Brassicaceae	2	2
5.	Caprifoliaceae	1	1
6.	Cistaceae	1	1
7.	Cyperaceae	1	1
8.	Euphorbiaceae	2	2
9.	Fabaceae	1	1
10.	Lamiaceae	2	2
11.	Poaceae	5	7
12.	Ranunculaceae	2	2
13.	Rosaceae	2	2

Процентное соотношение фитотрофных облигатно–паразитных микромицетов целинного степного участка окрестностей с. Ястребки Нижегородского района

представлено на рисунке 8. Согласно данным диаграммы, наибольшее количество видов паразитных грибов приходится на семейства Poaceae и Asteraceae – 40 %. На семейства Brassicaceae, Euphorbiaceae, Lamiaceae и Ranunculaceae приходится по 8 %, что составляет 32 % соответственно. А на остальные 7 семейств высших растений приходится по 4 %, что составляет 28 % от общего числа обнаруженных видов. В целом, паразитные фитотрофные микромицеты были обнаружены на 24 видах питающих растений из 13 семейств, 13 порядков, двух классов и одного отдела высших растений.

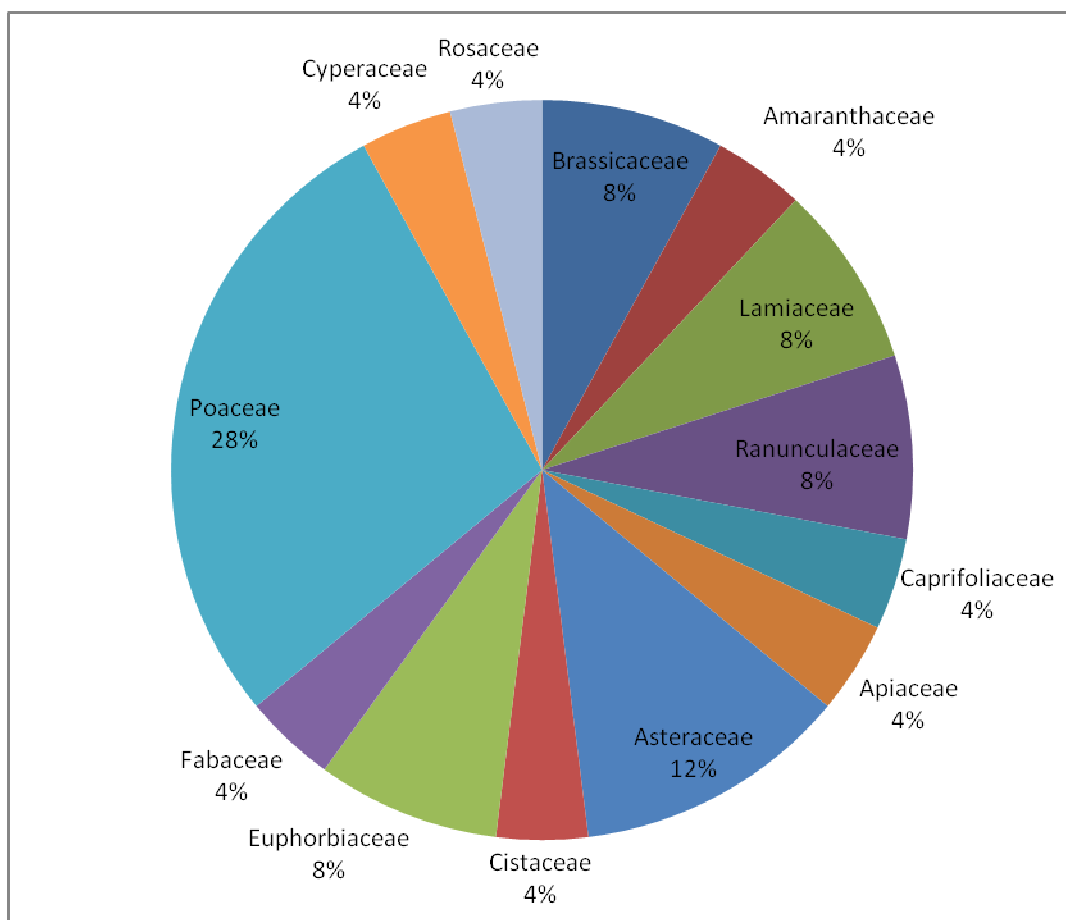


Рис. 8. Соотношение семейств растений-хозяев целинного степного участка окрестностей с. Ястребки Нижнегорского района Республики Крым, %.

Шесть наиболее поражаемых фитотрофными микромицетами семейств цветковых растений (Poaceae, Asteraceae, Euphorbiaceae, Lamiaceae и Brassicaceae) играют большую роль в сложении растительного сообщества целинного участка степи в окрестностях с. Ястребки Нижнегорского района, эти же семейства

являются лидерами видов растений-хозяев паразитных микромицетов на территории участка.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных микологических исследований за 2017–2018 годы на территории целинного степного участка в окрестностях с. Ястребки обнаружены 24 вида из 9 родов паразитных грибов, 7 семейств, 7 порядков и 7 классов, принадлежащих к 3 отделам грибов и грибоподобных организмов.

Грибы-паразиты обнаружены на 24 видах питающих растений из 13 семейств, 13 порядков, двух классов и одного отдела высших растений. Наибольшее количество видов грибов приходится на семейства Poaceae и Asteraceae (10 видов), что составляет 40 % от общего количества видов грибов.

Список литературы

1. Ена А. В. Природная флора Крымского полуострова. / Ена А. В. – Симферополь: Н. Оріанда, 2012. – 232 с.
2. Дудка І. О. Гриби природних зон Криму / [під ред. І. О. Дудки. / Дудка І. О., Гелюта В. П., Тихоненко Ю. А. та інш.; – Київ: Изд. Фітосоціоцентр, 2004. – 452 с. (Інститут ботаніки ім М. Г. Холодного НАНУ).
3. Благовещенская Е. Ю. Фитопатогенные микромицеты: учебный определитель / Благовещенская Е. Ю. – М.: изд-во ЛЕНАНД, 2015. – 240 с.
4. Купревич В. Ф. Определитель ржавчинных грибов СССР. / В. Ф. Купревич, В. И. Ульянищев – Минск: Изд-во Наука и техника, 1975, Ч. 1. – 485 с.
5. Ульянищев В. И. Определитель ржавчинных грибов СССР. / Ульянищев В. И. – Л.: Изд-во Наука, 1978, Ч. 2. – 384 с.
6. Станявичене С. А. Пероноспоровые грибы Прибалтики. / Станявичене С. А. – Вильнюс: Изд-во Мокслас, 1984. – 208 с.
7. Гелюта В. П. Флора грибов Украины. Мучнисторосяные грибы. / Гелюта В. П. – Киев.: Изд-во Наук. думка, 1989. – 256 с.
8. Каратыгин И. В. Семейство Устилаговые. / Каратыгин И. В., Азбукина З. М. – Л.: Изд-во Наука, 1989. – 220 с. (Определитель грибов СССР. Порядок Головневые; Вып. 1.).
9. Termorshuizen A. J. Roesten van Nederland (Dutch Rust Fungi). / Termorshuizen A. J. & Swertz C. A. – 2011. – 423 p.
10. Braun U. Taxonomic Manual of the Erysiphales (Powdery Mildews). The Netherlands, Utrecht: CBS-KNAW / Braun U., Cook R. T. A. // Fungal Biodiversity Centre. – 2012. – Vol. 11. – 707 p.
11. Mycobank Database [электронный ресурс]. 2004. Режим доступа: <http://www.mycobank.org>
12. Index Fungorum [электронный ресурс]. 2003. Режим доступа: <http://www.indexfungorum.org> [веб-сайт, версия 1.00] (дата обращения: 02.11.2019).
13. The Plant list [электронный ресурс]. 2013. Режим доступа: <http://www.theplantlist.org> / (дата обращения: 02.11.2019).
14. Леонтьев Д. В. Флористический анализ в микологии. Учебник для студентов высших учебных заведений. / Леонтьев Д. В. – Харьков: ПП «Ранок-НТ», 2008. – 110 с.
15. Vánky K. (2004a). New smut fungi (Ustilaginomycetes) from Mexico, and the genus Lundquistia. / Vánky K. // Fungal Diversity. 2004. – 17. – P. 159–190.
16. Vánky K. (2004b). The smut fungi (Ustilaginomycetes) of Bothriochloa, Capillipedium and Dichanthium (Poaceae). / Vánky K. // Fungal Diversity – 2004. – 15. – P. 221–246.
17. Vánky Kalman, [электронный ресурс]. Ustilaginales exsiccate (Vánky, Ust. exs.) No. 1–1350 (1960–2010). Режим доступа к сайту: <http://kalman-vanky.de>

18. Piątek M. *Jamesdicksonia irregularis*, newly recognized in Poland, with a note on the genus *Jamesdicksonia* (Ustilaginomycetes) / Piątek M., Prończuk M. // Polish Botanical Journal. – 2006. – 51(1). – P. 79–86.

**PHYTOTROPHIC OBLIGATE PARASITIC FUNGI OF THE WHOLE STEPPE
PLOT NEAR OF THE VILLAGE OF YASTREBKI OF THE NIZHNYNEGORSK
DISTRICT OF REPUBLIC CRIMEA**

Prosyannikova I. B., Kadochnikova V. I.

*V. I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Crimea, Russia
E-mail: aphanisomenon@mail.ru*

The aim of our work is to study the composition of phytotrophic obligate parasitic micromycetes of the whole steppe plot near of the village of Yastrebki of the Nizhnynegorsk district of Republic Crimea, Russia. The herbarium specimens of parasitic fungi on higher plants were collected during the vegetative seasons of 2017–2018 using a detailed-routing method in plant communities. The collected material was processed using the common method [3–10]. The nomenclature of micromycetes follows an international database «Index fungorum» and «Mycobank» [11, 12]. As a result of mycological research 24 species phytotrophic parasitic fungi belonging to 9 genera of 7 families, 7 orders, 7 classes and 3 divisions fungi and fungi like of organisms were found.

The highest number of genera (5; 55.6 % of total number) and species (20; 76.9 % of total number) are recorded in the division Basidiomycota. The division Ascomycota are presented by 4 genera (44.4 % of total genera number) and 4 species (15.4 %). The division Oomycota – 2 genera (22.2 %) and 2 species (7.7 % of total species number). We observed species of fungi listed on the representatives of the 13 families of higher plants (division Magnoliophyta – 13), mostly class Dicotyledons (Magnoliopsida) – 11 families; class Monocots (Liliopsida) represented by two families – Poaceae and Cyperaceae. The largest number of species of fungi falls on the family Poaceae and Asteraceae (10 species), which is 40.0 % of the total number of species of fungi-parasites. Phytotrophic fungi of near of the village of Yastrebki on 24 species of host plants of 13 families, 13 orders, the two classes and two divisions of higher plants were found.

Keywords: phytotrophic parasitic mycobiota, an annotated list, whole steppe plot, Steppe Crimea.

References

1. Yena A. V. *The natural flora of the Crimean peninsula*, 232 p. (Simferopol: Publishing house N. Orianda, 2012) (in Russ.).
2. Dudka I. O., Geluta V. P., Tichonenko Y. A. that insh. ed. I. O. Dudka. *Fungi natural areas Crimea* (Institute of botany named after M. G. Cholododny), 452 p. (Kiev: Phytosotsiotsentr , 2004) (in Ukrainian).
3. Blagoveshchenskaya E. Y. *Phytopathogenic micromycetes: educational guide*, 240 p. (Moscow: Publishing house. Lenand, 2015). (in Russ.).

4. Kuprevich V. F., Ulyanischev V. I. *Determinant of rust fungi of the USSR*, 485 p. (Science and Technology, Minsk, 1975). (in Russ.).
5. Ulyanischev V. I. *Determinant of rust fungi of the USSR*, 384 p. (Leningrad: Publishing House of Science, 1978. Part 2.). (in Russ.).
6. Stanyavichene S. A. *Peronosporales fungi*, 208 p. (Baltic.: Mokslas Publishing House, Vilnius, 1984). (in Russ.).
7. Gelyuta V. P. *Flora of Ukraine fungi. Powdery mildews fungi*, 256 p. (Publishing House of Sciences Dumka, Kiev, 1989). (in Russ.).
8. Karatygin I. V., Azbukina Z. M. *Ustilagaceae of family*. 220 p. (Publishing House of Science, 1989). (The determinant of the USSR Order of fungi Smut, Issue 1.). (in Russ.).
9. Termorshuizen A. J. & Swertz C. A. *Roesten van Nederland (Dutch Rust Fungi)*. 423 p. 2011. (in English).
10. Braun U., Cook R. T. A. *Taxonomic Manual of the Erysiphales (Powdery Mildews)*. 707 p. The Netherlands, Utrecht: Publishing House CBS-KNAW // Fungal Biodiversity Centre, **11**. (2012) (in English).
11. Mycobank Database[electronic resource]. 2004. Access: <http://www.mycobank.org> [web site, version 1.00] (reference date: 02. 11. 2019). (in English).
12. Index Fungorum [electronic resource]. 2003 Access: <http://www.indexfungorum.org> [web site, version 1.00] (reference date: 02. 11. 2019). (in English).
13. The Plant list [electronic resource]. 2013. Access mode: <http://www.theplantlist.org> [web site, version 1.00] (reference date: 02. 11. 2019). (in English).
14. Leontyev D. V. Floristic analysis in mycology. 110 p. Textbook for students of higher educational institutions. (Kharkov: Publishing House PP "Ranok-NT", 2008). (in Russ.).
15. Vánky K. New smut fungi (Ustilaginomycetes) from Mexico, and the genus *Lundquistia*. *Fungal Diversity*, **17**, 159 (2004a). (in English).
16. Vánky K. The smut fungi (Ustilaginomycetes) of *Bothriochloa*, *Capillipedium* and *Dichanthium* (Poaceae). *Fungal Diversity*, **15**, 221 (2004b). (in English).
17. Vánky Kalman, [electronic resource]. Ustilaginales exsiccate (Vánky, Ust. exs.) No. 1-1350 (1960-2010). Access mode: <http://kalman-vanky.de>. (in English).
18. Piątek M., Prończuk M. *Jamesdicksonia irregularis*, newly recognized in Poland, with a note on the genus *Jamesdicksonia* (Ustilaginomycetes), *Polish Botanical Journal*, **51**, **1**, 79 (2006) (in English).

УДК 57.084.1

**ПОКАЗАТЕЛИ КАРДИОРЕСПИРАТОРНОЙ СИСТЕМЫ КРЫС ПРИ
ДЕЙСТВИИ СПЕЙСЕРИРОВАННОГО КОМПЛЕКСА БИС(2-ПИРИДИЛ)-3-
(1,2,4-ТРИАЗОЛИЛ)ПРОПАНА И 11-ГИДРОКСИ-1,1-
ЭТИЛИДЕНДИФОСФОНОВОЙ КИСЛОТЫ**

Раваева М. Ю., Чуян Е. Н., Черетаев И. В., Придатко А. И., Шульгин В. Ф.

*Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», Симферополь, Республика Крым, Россия
E-mail: ravaevam@yandex.ru*

В работе исследовалась реакция кардиореспираторной системы крыс на введение спейсированного комплекса бис(2-пиридил)-3-(1,2,4-триазолил)пропана и 11-гидрокси-1,1-этилидендифосфоновой кислоты (БТП+ГДК). Показано, что при однократном введении в дозах 5 и 50 мг/кг проявляет дозозависимое гипотензивное и вазорелаксирующее действие, отрицательное хронотропное влияние, причем, максимальный эффект достигается при введении дозы 50 мг/кг. При длительном введении (в отличие от однократного) БТП+ГДК демонстрирует гипертензивное и положительное хронотропное действие, наступление которого зависит от дозы и кратности введения соединения: при введении БТП+ГДК в дозе 5 мг/кг данный эффект наступает после 15-тикратного, а в дозе 50 мг/кг – после 10-тикратного введения.

Ключевые слова: биоскрининг, 1-гидроксиэтан-1,1-дифосфоновая кислота, кардиореспираторная система, частота сердечных сокращений, частота дыхания, артериальное давление, показатели микроциркуляции.

ВВЕДЕНИЕ

Широкий спектр биологического действия и разноплановый характер производных триазола и дифосфоновых кислот привлекает внимание ученых для дальнейшего направленного синтеза и модификации их структуры с целью создания новых лекарственных препаратов. Среди производных триазола наибольший интерес представляет бис(2-пиридил)-3-(1,2,4-триазол) пропан (БТП) – новосинтезированное производное триазола, биологические свойства которого были исследованы в наших предыдущих работах [1, 2]. В частности, показано, что БТП в дозе 50 мг/кг проявляет гипотензивное, вазорелаксирующее и отрицательное хронотропное действия. В дозе 100 мг/кг БТП, наоборот, оказывает гипертензивный, вазоконстрикторный и положительный хронотропный эффекты. В более высоких дозах (150 и 200 мг/кг) БТП не проявляет выраженной активности на показатели кардиореспираторной системы. Среди производных дифосфона нами исследована 1-гидроксиэтан-1,1-дифосфоновая кислота (ГДК) и показано [3], что ГДК в дозах 5 и 50 мг/кг оказывает гипотензивное, вазодилатирующее действия на уровне микрорусла, отрицательное хронотропное влияние, урежает

частоту дыхания. Высокие дозы ГДК оказывают гипертензивное, положительное хронотропное влияние и повышают частоту дыхания.

В целом, результаты наших предыдущих исследований убедительно продемонстрировали перспективность дальнейших исследований в области целенаправленного синтеза и биоскрининга данных соединений. Действительно, дифосфонатные лиганды способны реализовывать различные способы связывания с катионами металлов, что создает предпосылки для получения координационных соединений с оригинальными молекулярными и супрамолекулярными структурами, а 1,2,4-триазолы являются удобной матрицей для сборки координационных соединений различной ядерности и топологии. Исходя из этого, на основе 1-гидрокси-1,1-этилидендифосфоновой кислоты (ГДК) и бис(2-пиридил-1,2,4-триазилил-3)пропана (БТП) был получен их аддукт (БТП+ГДК) – гибридное соединение нового поколения, которое может обладать новыми биологическими свойствами. В связи с этим целью настоящего исследования является установление влияния соединения БТП+ГДК на показатели кардиореспираторной системы крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось на базе Центра коллективного пользования научным оборудованием «Экспериментальная физиология и биофизика» кафедры физиологии человека и животных и биофизики КФУ имени В. И. Вернадского.

Для эксперимента отбирали здоровых половозрелых самцов и самок лабораторных крыс массой 180–200 г линии Вистар («ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово»), прошедших карантин не менее 14 дней. Животных содержали в стандартных условиях вивария при температуре 18–22 °С на подстиле «Рехофикс МК 2000» (на основе початков кукурузы) с естественным 12-часовым свето-темновым циклом, свободным доступом к воде (ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур») и полноценному гранулированному корму ГОСТ Р-50258-92.

Исследования проводили на животных, характеризующихся средней двигательной активностью и низкой эмоциональностью в тесте «открытого поля», которые составляют большинство в популяции, и поэтому у них развивается наиболее типичная реакция на действие различных факторов [4], в том числе и тестируемых химических соединений.

В исследованиях острой токсичности на животных после однократного введения комплекса БТП+ГДК было установлено, что LD₂₀, при которой наблюдалась первая смертность животных, составила 200 мг/кг; LD₅₀ – 350 мг/кг, а абсолютная летальная доза, которая рассчитывалась методом пробит-анализа, составила 570 мг/кг, что позволяет отнести этот комплекс к 3 классу опасности – умеренно токсичным веществам.

Экспериментальные исследования проводились в два этапа. На первом этапе исследований использовались 70 крыс (35 самцов и 35 самок), которых разделили на 5 групп по 14 особей в каждой, 7 из которых самцы, 7 – самки. Первая группа являлась биологическим контролем (К); вторая – пятая группы животных –

экспериментальные (Э), получавшие ГДК+БТП однократно внутривенно (объем 0,2 мл) в концентрациях, согласно исследованию острой токсичности, 5, 50, 100 и 200 мг/кг (Э-5, Э-50, Э-100, Э-200 соответственно). Животным контрольной группы одновременно с экспериментальными, вводили физиологический раствор (NaCl, 0,9 %) того же объема.

На втором этапе экспериментов исследовались изменения функционирования кардиореспираторной системы крыс при длительном (21-кратном) введении БТП+ГДК. Перед началом исследования отбирали животных, у которых уровень САД и ДАД превышал средние значения АД, характерные для нормотензивных крыс линии Вистар ($> \text{САД } 105 \pm 2 \text{ мм. рт. ст.}, \text{ДАД } 66 \pm 3 \text{ мм. рт. ст.}$).

Учитывая результаты первого этапа исследований, БТП+ГДК вводили ежедневно в одно и то же время суток (с 10.00 до 12.00) в дозах 5 и 50 мг/кг. Исследования проводились на 30 крысах-самцах, которые были разделены на 3 группы: контрольная ($n=10$, животным вводили физиологический раствор (NaCl, 0,9 %), экспериментальные Э-5 ($n=10$) и Э-10 ($n=10$), животным которых вводили 5 и 50 мг/кг соединения соответственно.

Тестируемое вещество БТП+ГДК создано на кафедре общей и неорганической химии факультета биологии и химии (профессор Шульгин В. Ф.) Таврической академии ФГАОУ «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского» (химическая чистота составляла не менее 98,0 %).

Биоскрининг БТП+ГДК проводился через 1 час после его внутривенного введения в указанных концентрациях, поскольку в данный период времени достигается максимальная концентрация ГДК и БТП в крови. После этого у животных всех групп регистрировали показатели кардиореспираторной системы: частоту сердечных сокращений (ЧСС), частоту дыхания (ЧД), систолическое (САД) и диастолическое артериальное давление (ДАД), а также показатели микроциркуляции (Мц). В первой серии исследований показатели кардиореспираторной системы регистрировали после однократного введения, а во второй серии – после 1-, 5-, 10, 15, и 21-кратного введения БТП+ГДК.

АД, ЧСС и ЧД у крыс регистрировали с помощью системы NIBP200A («Biorac Systems, Inc.», США). Запись и обработка данных производилась на компьютере с помощью программы «AcqKnowledge 4.2 for MP150».

Регистрация Мц проводилась при помощи лазерного анализатора кровотока «Лазма-МЦ» (производство НПП «Лазма», Россия) с использованием программы LDF 2.20.0.507WL. В качестве параметров, анализируемых методом ЛДФ, регистрировали неосцилляторные показатели базального кровотока: показатель перфузии (ПМ, перф. ед.), среднее квадратичное отклонение (флакс, СКО, перф. ед.), коэффициент вариации (КВ, %) [5]. С помощью вейвлет-анализа ЛДФ-сигнала определяли амплитуды колебаний кровотока разных частотных диапазонов. Наиболее низкая частота (0,0095–0,02 Гц) характерна для эндотелиальных колебаний (Аэ), обусловленных периодическими сокращениями цитоскелета эндотелиоцитов. Эндотелиальные колебания отражают воздействие гуморально-метаболических факторов на микрососудистое русло и характеризуют состояние нутритивного кровотока [5]. Колебания в частотах 0,07–0,15 Гц, или миогенные колебания (Ам),

обусловлены периодической активностью гладкомышечных волокон артериол, приводящих к изменению диаметра их просвета (вазомоции) [6]. На такую периодичность констрикции и дилатации микрососудов накладываются нейрогенные колебания (A_n) (0,02–0,046 Гц), отражающие симпатическую регуляторную активность [7]. К высокочастотным колебаниям относятся дыхательные (A_d , 0,15–0,4 Гц) и пульсовые (A_c , 0,8–0,16 Гц). Дыхательные волны представлены периодическими изменениями давления в венозном отделе сосудистого русла, вызываемыми дыхательными экскурсиями грудной клетки [7]. Пульсовые колебания кровотока обусловлены перепадами внутрисосудистого давления, которые в большей или меньшей степени синхронизированы с кардиоритмом [7].

Подробная методика регистрации параметров АД, ЧСС, ЧД и Мц подробно описана в [3].

Для статистической обработки были использованы данные трёх повторений эксперимента. Применялись непараметрические методы статистики, поскольку распределение значений переменных отличалось от нормального. Расчеты, статистическая обработка и графическое оформление полученных в работе данных по действия тестируемых соединений проводились с использованием программы Microsoft Excel и программного пакета StatSoft\STATISTICA 8. Достоверность статистических различий между контрольной и экспериментальными группами определяли с помощью критерия Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведения первого этапа исследований с однократным введением БТП+ГДК установлено, что показатели систолического и диастолического артериального давления при введении 5 мг/кг комплекса БТП+ГДК снижаются недостоверно, в дозе 50 мг/кг снижаются на 7,4 % ($p \leq 0,05$) и 19,2 % ($p \leq 0,05$) соответственно по сравнению с таковыми в контрольной группе животных (табл. 1). ЧСС при введении БТП+ГДК в дозе 5 мг/кг достоверно снижается на 5,5 % ($p \leq 0,05$), а в дозе 50 мг/кг достоверно не изменяется. Частота дыхания при использовании комплекса БТП+ГДК в дозе 5 мг/кг снижается на 7,1 % ($p \leq 0,05$), а в дозе 50 мг/кг достоверно не изменяется. Использование комплекса БТП+ГДК в дозах 100 мг/кг и 200 мг/кг привело к повышению артериального давления и ЧСС ($p \leq 0,05$).

Исследования показателей Мц при введении комплекса БТП+ГДК показали (рис. 1), что при введении дозы 5 мг/кг у животных зарегистрировано повышение амплитуд эндотелиальных ($A_э$, на 13 %, $p \leq 0,05$) и пульсовых колебаний (A_c , на 12 %, $p \leq 0,05$), а также ПМ – на 8 % ($p \leq 0,05$) по отношению к таковым в контрольной группе животных. При повышении дозы комплекса БТП+ГДК до 50 мг/кг происходило значительное увеличение перфузии тканей (на 27 %, $p \leq 0,05$) за счет достоверного увеличения активности всех регуляторных механизмов контроля микроциркуляции: $A_э$ увеличился на 47 % ($p \leq 0,01$), A_n – на 20 % ($p \leq 0,01$), A_m – на 24 % ($p \leq 0,01$), ($p \leq 0,05$), A_c – на 14 %, ($p \leq 0,05$), ПМ на 26 % ($p \leq 0,05$), а A_d снизился на 15 % ($p \leq 0,05$) по сравнению с таковыми показателями в контрольной группе животных. Повышение дозы производного до 100 и 200 мг/кг привело к снижению всех показателей Мц, однако данные изменения были не достоверны.

Таблица 1.
Показатели кардиореспираторной системы у крыс при однократном введении
аддукта бис(2-пиридил)-3-(1,2,4-триазалил)пропана и 11-гидрокси-1,1-
этилидендифосфоновой кислоты в разных концентрациях

Дозы (мг/кг) /группы	Пол (количество особей)	Показатели сердечно-сосудистой системы (M±m) и % от контроля			
		САД	ДАД	ЧСС	ЧД
контроль	Самцы (n=10)	135,7±2,01 100 %	82,4±1,16 100 %	377,4±1,79 100 %	90,66±2,10 100 %
	Самки (n=10)	135,37±1,59 100 %	80,30±0,93 100 %	364,20±1,75 100 %	88,57±1,25 100 %
	Среднее	135,53±1,25 100 %	81,35±0,76 100 %	370,80±1,94 100 %	89,61±1,21 100 %
Э-5	Самцы (n=10)	129,20±3,58 95,2 %	60,13±3,48 72,9 %	347,47±5,28 92,1 % p≤0,05	84,20±1,07 92,9 % p≤0,05
	Самки (n=10)	130,00±4,71 95,9 %	63,20±5,60 78,7 %	353,20±6,15 96,9 % p≤0,05	82,80±1,24 93,48 % p≤0,05
	Среднее	130,20±4,59 96,1 %	61,90±5,9 76,1 %	350,3±5,61 94,5 % p≤0,05	83,50±0,81 92,9 % p≤0,05
Э-50	Самцы (n=10)	123,60±2,14 91,08 % p≤0,05	65,20±2,35 79,1 % p≤0,05	357,80±1,98 94,8 %	82,20±6,20 90,7 %
	Самки (n=10)	125,80±2,48 92,9 % p≤0,05	66,40±2,48 82,7 % p≤0,05	357,00±4,16 98,1 %	82,00±5,82 92,6 %
	Среднее	125,5±1,82 92,6 % p≤0,05	65,8±2,18 80,8 % p≤0,05	357,4±3,34 96,5 %	83,50±5,16 93,2 %
Э-100	Самцы (n=10)	150,00±6,16 110,5 % p≤0,05	104,00±3,06 126,2 % p≤0,05	408,33±4,91 108,2 % p≤0,05	94,67±1,45 104,4 %
	Самки (n=10)	150,67±6,19 111,3 % p≤0,05	103,00±3,21 128,3 % p≤0,05	402,33±2,96 110,5 % p≤0,05	96,00±3,06 108,4 %
	Среднее	150,37±6,03 111 % p≤0,05	103,5±2,98 127,2 % p≤0,05	405,3±3,70 106,9 % p≤0,05	95,17±2,35 106 %
Э-200	Самцы (n=10)	150,67±7,19 111,0 % p≤0,05	103,00±3,21 125,0 % p≤0,05	402,33±2,96 106,6 % p≤0,05	96,00±3,06 105,9 %
	Самки (n=10)	157,67±7,76 116,4 % p≤0,05	112,33±1,45 139,8 % p≤0,05	420,00±2,89 115,3 % p≤0,05	92,67±1,45 104,6 %
	Среднее	154,17±7,87 113,8 % p≤0,05	110,50±1,06 135,8 % p≤0,05	411,17±3,40 110,9 % p≤0,05	94,67±2,52 104,7 %

Примечание: М – среднее арифметическое значение, М±m – ошибка среднего, p – уровень достоверности различий по критерию Манна-Уитни относительно контроля;

САД – систолическое артериальное давление; ДАД – диастолическое артериальное давление; ЧСС – частота сердечных сокращений; ЧД – частота дыхания.

Поскольку Аэ синхронизированы с периодическим релизингом оксида азота (NO) эндотелием сосудов [5, 6], то повышение данного показателя свидетельствует об увеличении секреции NO эндотелием и, как следствие, развитии эндотелий-зависимой вазодилатации. Повышение амплитуд колебаний ЛДФ-граммы в нейрогенном диапазоне (Ан), которые связаны с симпатическими адренергическими влияниями на гладкие мышцы артериол и артериоларных участков артериовенулярных анастомозов [5, 6] отражает снижение периферического сопротивления в данных областях микроула, следствием чего является улучшение нутритивного кровотока. Увеличение амплитуд миогенных ритмов (Ам) отражает снижение тонуса прекапиллярных сфинктеров и прекапиллярных метартериол [7]. Поскольку известно, что ритмы данного диапазона обусловлены колебаниями концентрации Ca^{2+} через мембраны мышечных клеток [6], следовательно, повышение Ам свидетельствует о снижении тонуса прекапилляров вследствие развития Ca^{2+} -зависимой мышечной релаксации под влиянием исследуемых веществ.

Полученные результаты свидетельствуют, что в дозах 5 и 50 мг/кг происходит дозозависимое повышение перфузии тканей за счет увеличения эндотелий-зависимой вазодилатации, снижения периферического сопротивления, увеличения притока крови в нутритивное микрососудистое русло, улучшения веноулярного оттока.

Выявлены и половые различия реакции микроциркуляции на действие БТП+ГДК. В дозе 100 и 200 мг/кг у самок не происходило достоверных изменений Мц (кроме Ам, который снижался на 38 %, $p \leq 0,05$), в то же время у самцов при введении соединения в дозе 100 мг/кг происходило достоверное снижение всех показателей Мц, а при дозе 200 мг/кг – наоборот, значительное повышение всех исследуемых показателей Мц.

Таким образом, БТП+ГДК при однократном введении в дозах 5 и 50 мг/кг проявляет дозозависимое гипотензивное и вазорелаксирующее действие, отрицательное хронотропное влияние, причем, максимальный эффект достигается при введении дозы 50 мг/кг.

Исходя из этого, на втором этапе исследования было уделено внимание реакциям кардиореспираторной системы на длительное 21-дневное введение данного соединения в дозах 5 и 50 мг/кг.

В ходе 21-кратного ежедневного введения БТП+ГДК установлено (рис. 2), что после однократного введения соединения направленность развития реакции кардиореспираторной системы была идентичной таковой в первой серии экспериментов. В то же время установлено, что изменения показателей кардиореспираторной системы зависят от дозы и кратности введения соединения. Так, в дозе 5 мг/кг показатели систолического и диастолического артериального давления после 5-ти и 10-кратного введения находились в пределах показателей в контрольной группе, однако после 15-тикратного введения БТП+ГДК наблюдалось достоверное повышение САД и ДАД на 12 % ($p \leq 0,05$) и 33 % ($p \leq 0,05$), а после 21-

кратного введения – на 14,9 % ($p \leq 0,05$) и 14,2 % ($p \leq 0,05$) соответственно относительно таковых в контрольной группе животных. При введении дозы 50 мг/кг достоверное повышение САД и ДАД происходило уже после 10-тикратного введения соединения, а максимальное повышение (на 31 % ($p \leq 0,05$) и 51 % ($p \leq 0,05$)) – после 21-кратного введения соединения.

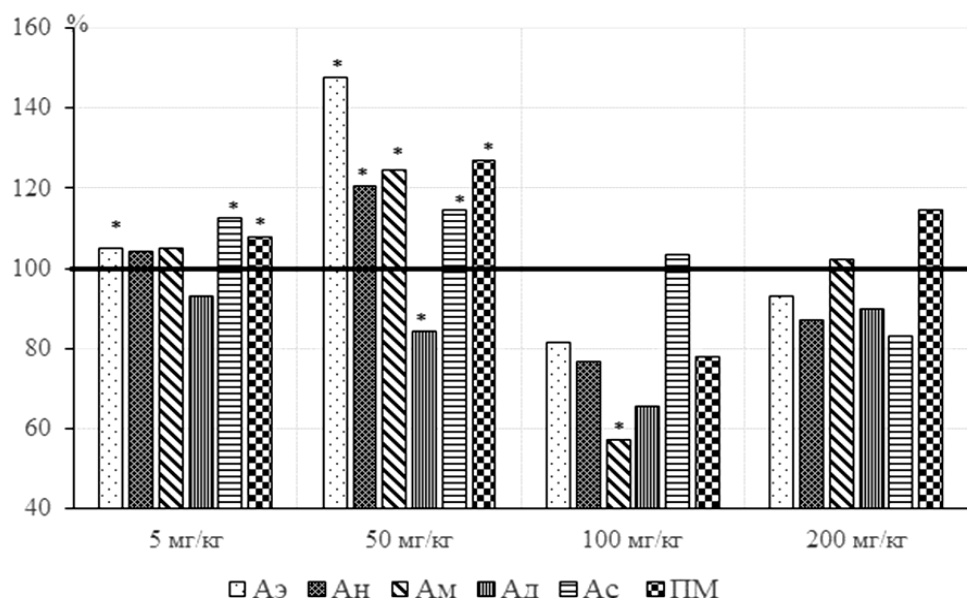


Рис. 1. Показатели микроциркуляции при однократном введении бис(2-пиридил)-3-(1,2,4-триазолил)пропана и 1-гидрокси-1,1-этилидендифосфоновой кислоты в разных концентрациях (в % по отношению к значениям в контрольной группе, принятым за 100 %).

Примечания: * – уровень достоверности различий по критерию Манна-Уитни относительно контроля при $p \leq 0,05$; Аэ – амплитуды эндотелиального генеза, АН – амплитуды нейрогенных колебаний, АМ – амплитуды миогенных колебаний, АД – амплитуды дыхательных колебаний, АС – амплитуды пульсовых колебаний, ПМ – показатель перфузии.

Показатели ЧСС (рис. 2) при введении БТП+ГДК в дозе 5 мг/кг достоверного уровня изменений не достигали. После 15-тикратного введения БТП+ГДК в дозе 50 мг/кг ЧСС увеличивалась на 5,8 % ($p \leq 0,05$), а после 21-кратного – на 8,4 % ($p \leq 0,05$) по отношению к таковым в контрольной группе животных.

Частота дыхания у животных при использовании комплекса БТП+ГДК в дозе 5 мг/кг не превышала значение данного показателя в контрольной группе животных, а в дозе 50 мг/кг постепенно увеличивалась и после 21-кратного введения возрастала на 12,3 % ($p \leq 0,05$) по отношению к контрольным значениям.

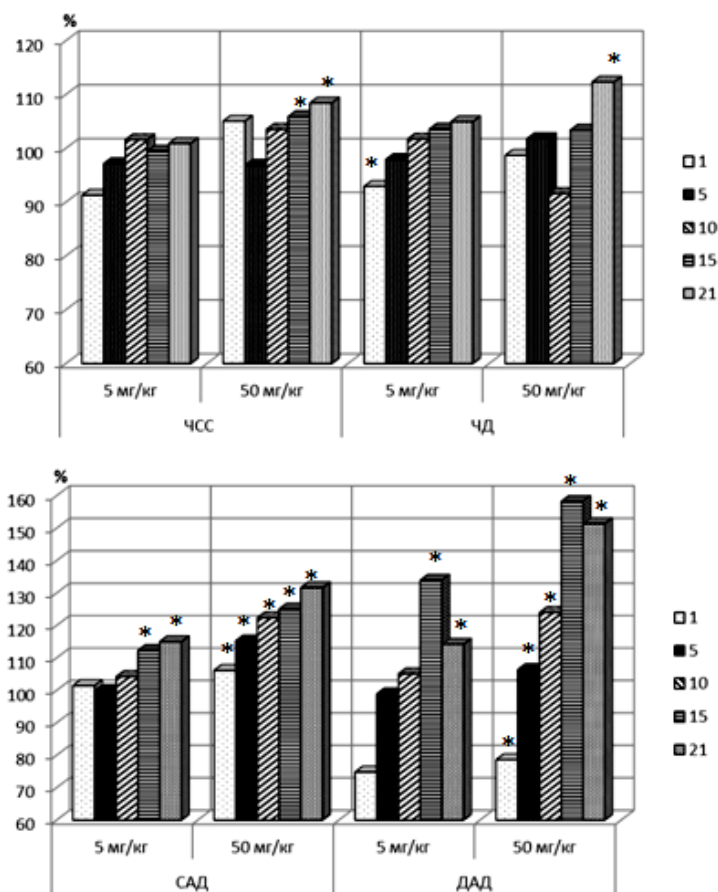


Рис. 2. Показатели кардиореспираторной системы у крыс при длительном введении аддукта бис(2-пиридил)-3-(1,2,4-триазалил)пропана и 11-гидроксидифосфоновой кислоты в дозах 5 и 50 мг/кг в % по отношению к таковым в контрольной группе животных.

Примечания: 1, 5, 10, 15 и 21 – кратность введения тестируемого соединения, остальные сокращения те же, что в табл. 1.

Таким образом, при длительном введении (в отличие от однократного) БТП+ГДК демонстрирует гипертензивное действие и положительное хронотропное действие, наступление которого зависит от дозы и кратности введения соединения: при введении БТП+ГДК в дозе 5 мг/кг данный эффект наступает после 15-тикратного, а в дозе 50 мг/кг – после 10-тикратного введения.

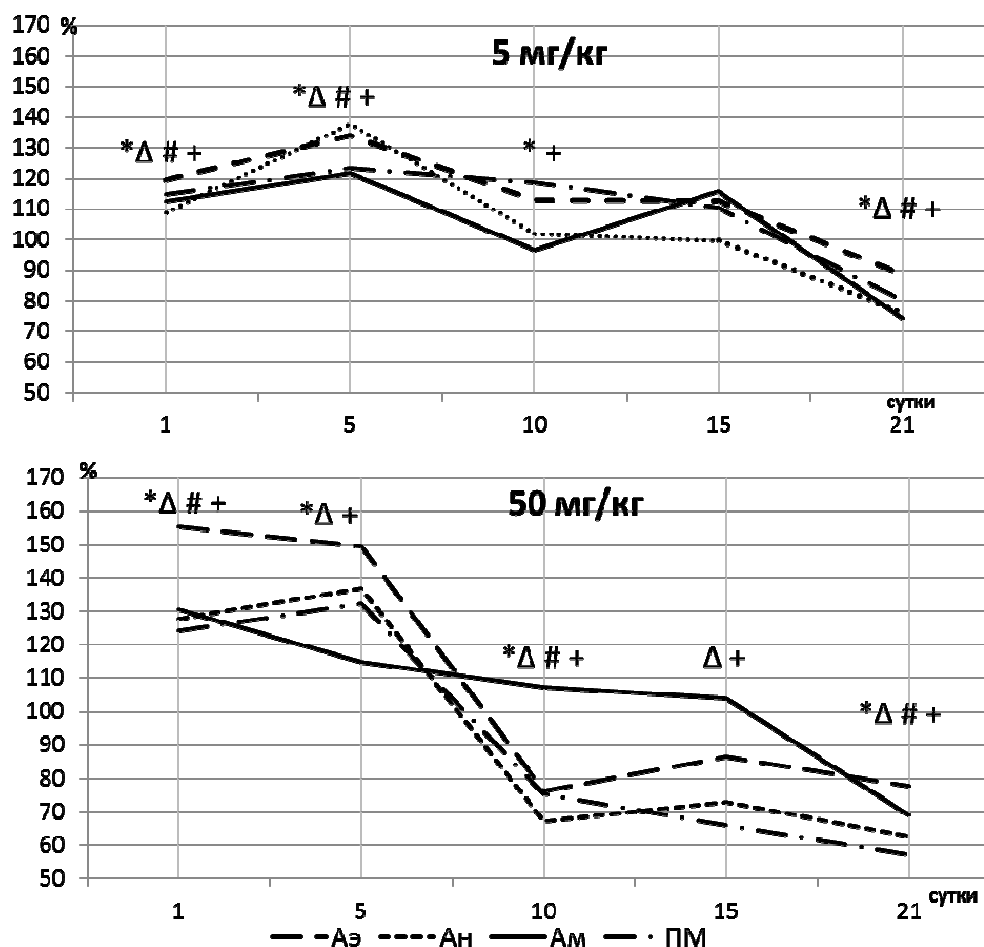


Рис. 3. Показатели микроциркуляции у крыс при действии БТП+ГДК в концентрациях 5 и 50 мг/кг (в % по отношению к таковым в контрольной группе животных).

Примечания: * – уровень достоверности различий по критерию Манна-Уитни Аэ – амплитуд эндотелиального генеза, Δ – уровень достоверности различий по критерию Манна-Уитни Ан – амплитуд нейрогенных колебаний, # – уровень достоверности различий по критерию Манна-Уитни Ам – амплитуд миогенных колебаний, + – уровень достоверности различий по критерию Манна-Уитни ПМ – показателя перфузии.

Исследования процессов Мц показали (рис. 3), что при введении БТП+ГДК в дозе 5 мг/кг максимальное повышение показателей Мц зарегистрировано после 5-тикратного введения, о чем свидетельствовало повышение Аэ на 33 % ($p \leq 0,05$), Ан – на 37 % ($p \leq 0,01$), Ам – на 21 % ($p \leq 0,01$), ПМ на 23 % ($p \leq 0,05$) по отношению к таковым в контрольной группе животных. После 10-тикратного введения выраженность вазодилатации снижалась: ПМ превышал таковые в контрольной группе животных на 18,7 % ($p \leq 0,01$), а Аэ – на 12,8 % ($p \leq 0,01$). При повышении

кратности введения БТП+ГДК эффективность его действия снижалась и после 10- и 15-тикратного не достигала уровня значимости, а после 21-кратного введения наблюдалось развитие вазоконстрикции, о чем свидетельствовало снижение Аэ на 11,4 % ($p \leq 0,01$), Ан – на 24 % ($p \leq 0,01$), Ам – на 26 % ($p \leq 0,01$), ПМ на 20 % ($p \leq 0,05$) по отношению к таковым в контрольной группе животных.

При введении комплекса БТП+ГДК в дозе 50 мг/кг максимальное увеличение показателей перфузии тканей регистрировалось после 5-тикратного введения соединения: Аэ увеличился на 49 % ($p \leq 0,01$), Ан – на 36 % ($p \leq 0,01$), Ам – на 24 % ($p \leq 0,01$), ПМ – на 32,4 % ($p \leq 0,05$) по сравнению с таковыми показателями в контрольной группе животных. Однако уже после 10-тикратного введения БТП+ГДК наблюдалось незначительное снижение показателей Мц, которое достигало значимого уровня после 15 введения БТП+ГДК, а после 21-кратного введения интегральный показатель перфузии тканей составил 57,2 % ($p \leq 0,05$) по сравнению с таковым в контрольной группе животных.

Следовательно, при длительном введении доз 5 и 50 мг/кг комплекса БТП+ГДК у животных наблюдалось постепенное снижение амплитуд всех ритмов Мц. Изменения показателей Мц более выражены при введении БТП+ГДК в дозе 50 мг/кг, поскольку вазодилатация, наблюдающаяся после 5-тикратного введения, сменялась вазоконстрикцией, наступающей после 15-тикратного введения.

Таким образом, реакция Мц на длительное введение БТП+ГДК выражалась в постепенном развитии вазоконстрикции за счет снижения метаболической активности эндотелия, увеличения периферического сопротивления и уменьшения притока крови в нутритивное микрососудистое русло. Скорость и выраженность развития вазоконстрикции напрямую зависела от дозы введения соединения: при применении дозы 50 мг/кг вазоконстрикция регистрировалась после 10-тикратного введения, а после 21-кратного перфузия тканей составляла 57,3 % от контрольных значений, а применение дозы 5 мг/кг сопровождалось менее выраженной вазоконстрикцией, развивающейся после 21-кратного введения БТП+ГДК.

Можно заключить, что эффекты комплекса БТП+ГДК при длительном введении меняют знак реакции кардиореспираторной системы организма на противоположный: гипотензивное и вазорелаксирующее действие, отрицательное хронотропное действие соединения при однократном его применении модифицируется в гипертензивное, вазоконстрикторное и положительное хронотропное. Поскольку данные эффекты характерны для высоких (100–200 мг/кг), близких к токсическим дозам БТП+ГДК (при однократном введении), можно предположить, что данное соединение способно накапливаться в организме и оказывать токсическое действие.

В целом, БТП+ГДК обладает противоишемическим (антиангинальным) эффектом, максимально выраженном при однократном применении в дозе 50 мг/кг и при более длительном (5-тикратном) – в дозе 5 мг/кг. БТП+ГДК проявляет выраженные вазорелаксирующие (противоишемические, антиангинальные) свойства, которые в сочетании с незначительным кардиотоническим и гипотензивным действием создают предпосылки для дальнейшего изучения этих

свойств БТП+ГДК в различных моделях патологии сердечно-сосудистой системы (например, ишемии, гипертензии).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. БТП+ГДК при однократном введении в дозах 5 и 50 мг/кг проявляет дозозависимое гипотензивное и вазорелаксирующее действие, отрицательное хронотропное влияние, причем, максимальный эффект достигается при введении дозы 50 мг/кг.
2. При однократном введении БТП+ГДК в дозах 5 и 50 мг/кг происходит дозозависимое повышение перфузии тканей за счет увеличения эндотелий-зависимой вазодилатации, снижения периферического сопротивления, увеличения притока крови в нутритивное микрососудистое русло, улучшения веноулярного оттока.
3. При длительном введении (в отличие от однократного) БТП+ГДК демонстрирует гипертензивное и положительное хронотропное действие, наступление которого зависит от дозы и кратности введения соединения: при введении БТП+ГДК в дозе 5 мг/кг данный эффект наступает после 15-тикратного, а в дозе 50 мг/кг – после 10-тикратного введения.
4. Реакция микроциркуляции на длительное введение БТП+ГДК выражалась в постепенном развитии вазоконстрикции за счет снижения метаболической активности эндотелия, увеличения периферического сопротивления и уменьшения притока крови в нутритивное микрососудистое русло, причем скорость и выраженность развития вазоконстрикции напрямую зависела от дозы введения соединения.
5. Эффекты комплекса БТП+ГДК при длительном введении меняют знак реакции кардиореспираторной системы организма на противоположный: гипотензивное и вазорелаксирующее действие, отрицательное хронотропное действие соединения при однократном его применении модифицируется в гипертензивное, вазоконстрикторное и положительное хронотропное.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ No 18-13-00024 «Координационные соединения дифосфонатов металлов со спейсеризованными 1,2,4-триазолами как основа новых гибридных материалов и лекарственных препаратов» на экспериментальном оборудовании центра коллективного пользования научным оборудованием «Экспериментальная физиология и биофизика» кафедры физиологии человека и животных и биофизики Таврической академии (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского».

Список литературы

1. Черетаев И. В. Влияние 1-гидрокси-1,1-этилиден-дифосфоновой кислоты и бис(2-пиридил-1,2,4-триазилил-3)пропана на болевую чувствительность самок крыс / И. В. Черетаев, Е. Н. Чуян, М. Ю. Раваева, В. Ф. Шульгин // Международный научно-исследовательский журнал. – 2019. – № 7 (85), Ч. 1. – С. 92–97. doi: 10.23670/IRJ.2019.85.7.018.

2. Черетаев И. В. Влияние бис(2-пиридил)-3-(1,2,4-триазолил)пропана на болевую чувствительность самцов и самок крыс / И. В. Черетаев, Е. Н. Чуян, М. Ю. Раваева, В. Ф. Шульгин // Сборник научных трудов VI Съезда биофизиков России: в 2 т., Т. 2. – Краснодар: Полиграфическое объединение «Плехановец», 2019 – С. 85–86. doi: 10.31429/SbR6.2019.001
3. Чуян Е. Н. Показатели кардиореспираторной системы крыс при действии 1-гидроксиэтан-1,1-дифосфоновой кислоты / Е. Н. Чуян, М. Ю. Раваева, А. И. Придатко, И. В. Черетаев, В. Ф. Шульгин // Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского. Биология, химия. – 2019. – Т. 5 (71), № 1. – С. 179–192.
4. Чуян Е. Н. Физиологические механизмы биологических эффектов низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ. / Е. Н. Чуян, Н. А. Темурьянц, О. Б. Москвичук : монография. – Симферополь: ЧП «Эльиньо», 2003. – 448 с.
5. Козлов В. И. Метод лазерной доплеровской флоуметрии / Козлов В. И., Мач Э. С., Литвин Ф. Б., Терман О. А., Сидоров В. В. // Пособие для врачей. – 2001. – 22 с.
6. Крупаткин А. И. Пульсовые и дыхательные осцилляции кровотока в микроциркуляторном русле кожи / А. И. Крупаткин // Физиология человека. – 2008. – 34(3). – С. 70.
7. Stefanovska A. Physics of the human cardiovascular system / A. Stefanovska, M. Bracic // Contemporary Physics. – 1999. – 40 (1). – P. 31.

INDICATORS OF THE RAT CARDIORESPIRATORY SYSTEM UNDER THE ACTION OF THE SPACER COMPLEX BIS(2-PYRIDYL)-3-(1,2,4-TRIAZOLYL)PROPANE AND 11-HYDROXY-1,1-ETHYLIDENDIPHOSPHONIC ACID

Ravaeva M. Yu., Chuyan E. N., Cheretaev I. V., Pridatko A. I., Shulgin V. F.

*V. I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Crimea, Russia
E-mail: ravaevam@yandex.ru*

The reaction of the cardiorespiratory system of rats to the introduction of a spacer complex bis(2-pyridyl)-3-(1,2,4-triazolyl)propane and 11-hydroxy-1,1-ethylidendiphosphonic acid (BTP+GDK) was investigated. It was established that BTP + GDK with a single administration at doses of 5 and 50 mg/kg exhibits dose-dependent hypotensive and vasorelaxing effect, negative chronotropic effect. the maximum effect is achieved with a dose of 50 mg/kg. With a single administration of BTP+GDK at doses of 5 and 50 mg/kg, a dose-dependent increase in tissue perfusion occurs due to an increase in endothelium-dependent vasodilation, a decrease in peripheral resistance, an increase in blood flow to the nutritive microvascular bed, and an improvement in venular outflow. With long-term administration of BTP + GDK shows hypertensive and positive chronotropic effect, the onset of which depends on the dose and multiplicity of the compound: with the introduction of BTP + GDK at a dose of 5 mg / kg, this effect occurs after 15-fold, and at a dose of 50 mg/kg-after 10-fold administration. The reaction of microcirculation to prolonged administration of BTP + GDK was expressed in the gradual development of vasoconstriction by reducing the metabolic activity of the endothelium, increasing peripheral resistance and reducing blood flow to the nutritive microvascular bed, and the speed and severity of vasoconstriction directly depended on the dose of the compound. The effects of the BTP+GDK complex with prolonged administration change

the sign of the reaction of the cardiorespiratory system of the body to the opposite: hypotensive and vasorelaxing action, the negative chronotropic action of the compound with its single application is modified into hypertensive, vasoconstrictor and positive chronotropic.

Keywords: screening, 1-hydroxyethane-1,1-diphosphonic acid, cardiorespiratory system, heart rate, respiratory rate, blood pressure, microcirculation indicators.

References

1. Cheretaev I. V., Chuyan E. N., Ravaeva M. Yu., Shulgin V. F. Influence of 1-hydroxy-1,1-ethylidene-diphosphonic acid and bis (2-pyridyl-1,2,4-triazolyl-3)propane on pain sensitivity of female rats, *international scientific research journal*, **7 (85)**, 92 (2019).
2. Cheretaev I. V., Chuyan E. N., Ravaeva M. Yu., Shulgin V. F. Influence of bis (2-pyridyl) - 3-(1,2,4-triazolyl)propane on pain sensitivity of male and female rats, *Proceedings of the VI Congress of biophysicists of Russia: in 2 vols*, 85-86 p. (2019).
3. Chuyan E. N., Temur'yants N. A., Moskovchuk O. B. *Fiziologicheskiye mekhanizmy biologicheskikh effektov nizkointensivnogo EMI KVCH*, monografiya, 448 p (CHP «El'in'o», Simferopol', 2003).
4. Chuyan E. N., Ravaeva M. Yu., Pridatko A. I., Cheretaev I. V., Shulgin V. F. Indicators of the rat cardiorespiratory system under the action of 1-hydroxyethane-1,1-diphosphonic acid, *Scientific notes of the Crimean Federal University named after V. I. Vernadsky. "Biology, Chemistry"*, **5 (71)**, 179 (2019).
5. Kozlov V. I., Mach E. S., Litvin F. B., Terman O. A., Sidorov V. V. Metod lazernoy dopplerovskoy floumetrii, *Manual for doctors*, 22 p. (2001).
6. Stefanovska A., Bracic M. Physics of the human cardiovascular system, *Contemporary Physics*, **40 (1)**, 31 p. (1999).
7. Krupatkin A. I. Pul'sovyye i dykhatel'nyye ostsillyatsii krovotoka v mikrotsirkulyatornom rusle kozhi, *Fiziologiya cheloveka*, **34(3)**, 70 p. (2008).

УДК 581.143.6;574.24

**ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К МЕДИ
(КАК К НЕБЛАГОПРИЯТНОМУ ЭКОЛОГИЧЕСКОМУ ФАКТОРУ) И
ОКИСЛИТЕЛЬНЫМ СТРЕССОМ НА ПРИМЕРЕ КАЛЛУСОВ ЛЬНА
МНОГОЛЕТНЕГО (*LINUM PERENNE* L.)**

Степанова А. Ю., Соловьева А. И., Таишиева И. И., Гладков Е. А.

*Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева Российской академии наук, Москва,
Россия
E-mail: gladkovu@mail.ru*

Известно, что многие изменения окружающей среды, в том числе загрязнение тяжелыми металлами, приводят к образованию избыточного количества активных форм кислорода, которые вызывают деградацию биомолекул и развитие окислительного стресса. В нашей работе оценена интенсивность развития окислительного стресса в каллусах льна многолетнего (*Linum perenne* L.) при действии меди, как неблагоприятного экологического фактора. Показано, что ионы меди при концентрации 300–1000 μM сильно ингибируют рост каллусов и приводят к увеличению содержания малонового диальдегида (МДА) – индикатора перекисного окисления липидов, что свидетельствует о возникновении окислительного стресса. В результате проведенных экспериментов было установлено, что ранее отобранная на параквате (агент, вызывающим образование активных форм кислорода) клеточная линия льна, обладала более высокой устойчивостью к ионам меди, чем контрольные каллусы.

Ключевые слова: *Linum perenne* L., каллус, медь, окислительный стресс.

ВВЕДЕНИЕ

В связи с быстрым ростом и развитием городской инфраструктуры (промышленного производства, транспортной системы) нарастает антропогенное давление на окружающую среду, в том числе увеличивается содержание тяжелых металлов, которые в настоящее время являются одними из основных загрязнителей городских экосистем [1]. Загрязнение тяжелыми металлами оказывает негативное влияние на растения: ингибирует их рост, продуктивность и существенно снижает декоративные качества [2, 3]. Степень негативного действия тяжелых металлов, даже тех, которые в небольших количествах необходимы растению для нормальной жизнедеятельности, зависит от их концентрации. При высоком содержании тяжелых металлов происходит ингибирование активности ферментов, в результате связывания их ионов с функциональными группами белков; инактивация ферментов и других биомолекул, путем прямого замещения катионов из специфических сайтов связывания (например, замещение Mg^{2+} на Cd^{2+} в рибулозодифосфаткарбоксилазе) [4–6]. Однако многие исследования последних лет указывают, что существенную роль в повреждении растительных клеток играет окислительный стресс. Тяжелые

металлы с переменной валентностью (медь, хром, железо) относят к “редокс-активным” металлам, генерирующим образование гидроксильных радикалов, которые являются наиболее агрессивным типом активных форм кислорода (АФК) [7, 8]. Другие тяжелые металлы, такие как кадмий, свинец, никель и цинк, могут опосредованно влиять на образование АФК за счет вызываемых ими нарушений процесса фотосинтеза [9, 10]. Медь – один из основных загрязнителей окружающей среды, поскольку она широко используется в промышленности и сельском хозяйстве [11, 12]. Медь один из основных неблагоприятных экологических факторов для растений городских экосистем, из-за высокого содержания в почве [1] и фитотоксичности, например для некоторых исследуемых видов растений ряд токсичности выглядит следующим образом $Cu > Ni > Cd > Pb > Hg > Fe > Mo > Mn$ [13]. Высокое содержание меди в почве обусловлено не только выбросами промышленных предприятий, но и движением автотранспорта. В составе загрязнителей у автомагистралей присутствует медь [14].

В прямых экспериментах было показано, что катионы меди вызывают как увеличение содержания малонового диальдегида (МДА), свидетельствующее о перекисном окислении липидов, так и повышение активности ряда ферментов антиоксидантной защиты, в первую очередь супероксиддисмутазы (СОД) [15, 16]. Следовательно, существует вероятность, что клеточные механизмы, отвечающие за устойчивость клеток к окислительному стрессу, могут также способствовать и их толерантности к повышенным концентрациям ионов меди.

Лён многолетний – растение, широко используемое в цветоводстве и городском озеленении для создания рабаток, альпинариев и мавританских газонов. Однако в настоящий момент существует мало сведений о его реакции на действие тяжелых металлов. Культуры *in vitro* являются удачной системой для изучения влияния стресса непосредственно на клетки и получения устойчивых клеточных линий и растений. Поэтому в качестве объекта исследования в нашей работе были использованы каллусы льна многолетнего.

Целью нашей работы было изучение интенсивности развития окислительного стресса в культивируемых *in vitro* клетках льна многолетнего при действии ионов меди и оценка толерантности к ним линий устойчивых к окислительному стрессу, которые были ранее получены с помощью клеточной селекции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали лён многолетний (*Linum perenne* L., сорт “Синий шёлк”). Семена льна стерилизовали 7 % раствором гипохлорита натрия в течение 20 мин, с последующей трехкратной промывкой стерильной дистиллированной водой в течение 10 мин.

Для получения каллусной ткани семядоли стерильно выращенных 14-дневных проростков помещали на модифицированную среду Мурасиге-Скуга [17] с 2 мг/л НУК, 4 мг/л кинетина, 0,1 мг/л 2,4-Д. Используемая среда была подобрана в нашем предыдущем исследовании [18]. Культивирование полученных каллусов проводили при температуре +25 °С и 16-часовом фотопериоде. Цикл культивирования составлял четыре недели.

Для оценки реакции клеток на стресс, вызванный ионами меди, каллусы были помещены на стерильную фильтровальную бумагу, пропитанную жидкой средой, содержащей сульфат меди ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) с конечным содержанием Cu^{2+} – 300 μM , 600 μM , 1000 μM . В качестве контроля использовали каллусы, выращиваемые на той же среде, но без добавления меди.

Для характеристики роста культуры использовали показатель «индекс роста» (I). Вычисление проводили по следующей формуле: $I = (X_{\text{max}} - X_0) / X_0$,

где X_{max} – наибольшее достигнутой культурой значение сырой массы (г), X_0 – начальная сырая масса культуры (г). Индекс роста выражали в % относительно контроля.

Содержание МДА в каллусах определяли по цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК), основанному на образовании в кислой среде окрашенного триметинового комплекса, имеющего характерный спектр поглощения с максимумом $\lambda = 532$ нм [19]. Количество МДА выражали в мкмоль/г сырой массы. Определение проводили на 3, 7 и 14 сутки после помещения каллусов на среды с различным концентрациями меди.

В экспериментах, связанных с изучением устойчивости к меди каллусов толерантных к окислительному стрессу, использовали линии, полученные ранее [18].

Все эксперименты проводили в трехкратной повторности. Статистическую обработку данных проводили с помощью компьютерной программы Microsoft® Excel. В тексте и таблицах приведены средние арифметические величины параметров и их доверительные интервалы при 95%-ном уровне вероятности по t-критерию Стьюдента. На диаграммах указаны величины доверительных интервалов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки реакции на стресс, вызванный ионами меди, используют широкий диапазон концентраций (от 0,1 μM до 1000 mM и выше), поскольку чувствительность растений и каллусов к ионам данного металла значительно зависит от вида растения. Например, для каллусов табака применяли концентрации 1–100 μM [20]; для каллусов редиса – 10–1000 μM [21]; для газонных трав от 1000 μM и выше [22].

В почвенных условиях небольшое ингибирование роста побегов в почве (ингибирование более 20 %, по сравнению с контролем – растениями, растущими в почве без меди) наблюдалось при концентрации 300 μM , при содержании 600 μM проявлялось большее негативное действие меди – рост побегов составлял 62 % от контроля. Таким образом, показано большее ингибирование роста побегов при повышении содержания меди.

Однако, наибольшей чувствительностью к действию меди обладает корневая система. Исследования в водных растворах показали большую токсичность меди для корней, при содержании 600 μM меди длина главного корня составляла 10 % от контроля, концентрация 1000 μM меди была практически летальной. Поэтому

данная концентрация меди была использована в качестве максимальной для дальнейших исследований.

На следующем этапе было оценено влияние разных концентраций меди на рост каллусов льна. Ранее были разработаны модифицированные среды Мурасиге-Скуга и Гамборга для получения каллусов различных видов декоративного льна [19, 23].

Нами было установлено, что на среде с 300 μM меди происходило подавление роста каллусов на 60 % относительно контроля. При 600 и 1000 μM меди жизнеспособность сохранялась только у 13 и 5 % каллусов, соответственно (рис. 1). Полученные данные свидетельствуют о том, что культивируемые клетки льна обладают средней толерантностью к меди: они обладают большей устойчивостью, чем каллусы редиса и табака [19, 20], но меньшей, чем каллусы газонных трав [21]. Вероятно, это связано с тем, что однодольные растения менее чувствительны к меди, чем двудольные.

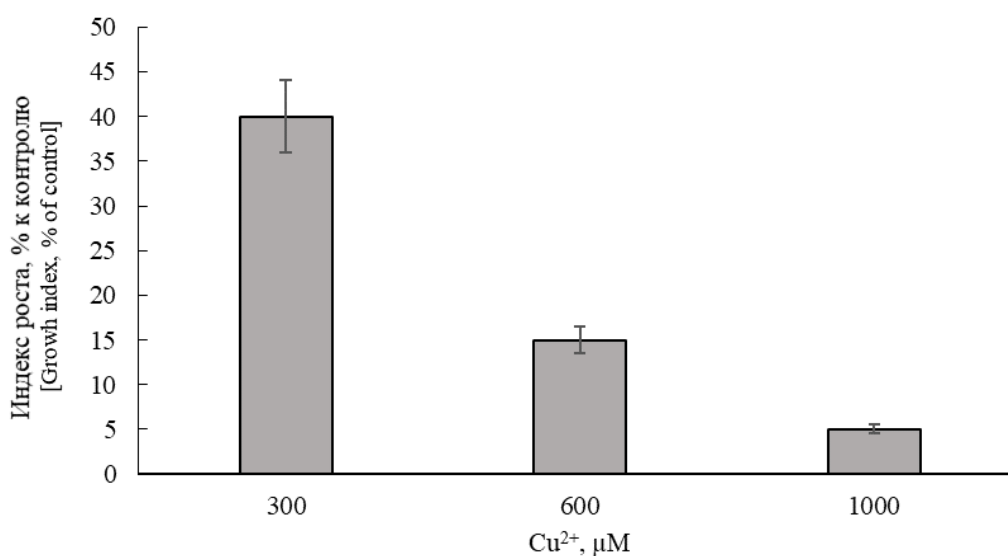


Рис. 1. Влияние различных концентраций меди на рост каллусов *Linum perenne* L.

В результате перекисного окисления липидов в клетках растений происходит образование МДА, поэтому уровень его содержания в растительном материале используют в качестве показателя интенсивности окислительного стресса. В нашем исследовании содержание МДА во всех вариантах, выращиваемых в присутствии меди, был выше, чем в контроле (рис. 2). Уже через 3 суток после перемещения каллусов на среды с повышенным содержанием меди было отмечено постепенное развитие окислительного стресса. При этом содержание МДА на 3 суток коррелировало с концентрацией ионов меди в среде. Следует отметить, что на среде с 1000 μM меди на 7 сутки опыта было зарегистрировано некоторое снижение содержания МДА, которое на 14 сутки еще больше сокращалось. Вероятно, это связано с постепенной гибелью клеток в данном варианте опыта. При этом

максимальное содержание МДА на 14 сутки эксперимента было зарегистрировано на среде, содержащей 300 μM меди. Таким образом, при воздействии Cu^{2+} у каллусов льна развивается окислительный стресс, сила которого зависит от концентрации ионов и продолжительности воздействия.

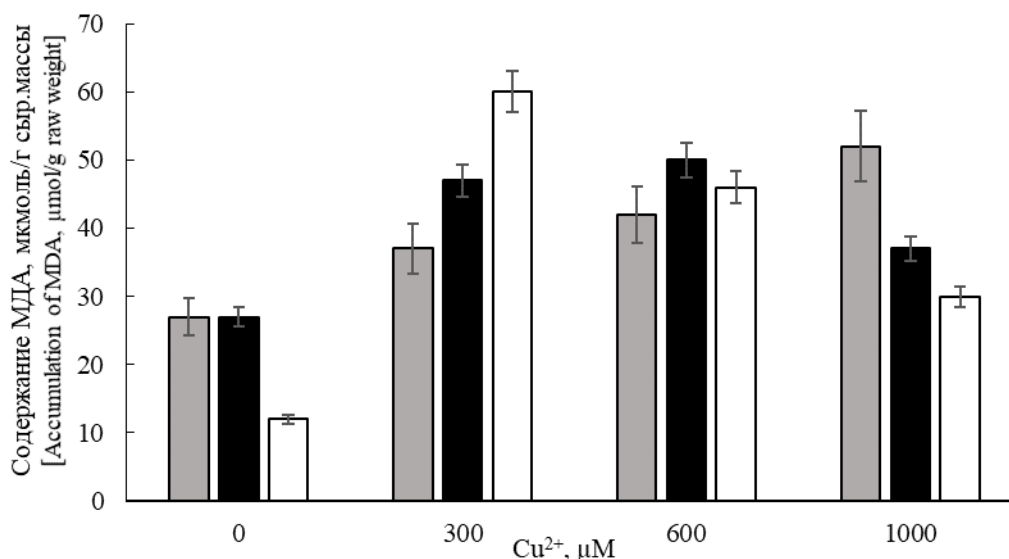


Рис. 2. Влияние различных концентраций меди на накопление МДА в каллусах *Linum perenne* L.; серые колонки – 3 сут, черные – 7 сут, белые – 14 сут

Была проведена оценка клеточных линий, полученных ранее с помощью клеточной селекции и обладающих высокой активностью СОД, на устойчивость к меди. Использование параквата для получения клеточных линий с повышенной устойчивостью к окислительному стрессу связано с тем, что он вызывает образование супероксид радикала и провоцирует гибель чувствительных к АФК клеток и отбору устойчивых. Нами было показано, что линии, отобранные на параквате, значительно лучше росли на среде с 300 μM меди, жизнеспособность отобранных клеточных линий была в 2,5 раза выше, чем у контрольных каллусов.

Таким образом, клеточные линии с более высокой устойчивостью к окислительному стрессу, вызванному паракватом, могут быть основой для получения растений, устойчивых к загрязнению медью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашей работе была оценена реакция каллусных клеток льна многолетнего на стресс, вызванный повышенными концентрациями ионов меди (300–1000 μM). Показано, что во всех вариантах происходило значительное повышение МДА, указывающее на развитие окислительного стресса. Наиболее высокое содержание

МДА было зарегистрировано на среде с добавлением 300 мМ меди на 14 сут. Именно эту концентрацию мы использовали для дальнейшей проверки линий, ранее отобранных на параквате (гербициде, основное повреждающее действие которого связано с продуцированием окислительного стресса). Жизнеспособность отобранных клеточных линий была в 2,5 раза выше, чем в контроле, что свидетельствует о перспективности использования агентов, вызывающих образования АФК для получения устойчивых к меди форм растений.

Список литературы

1. Обзор состояния и загрязнения окружающей среды в РФ за 2018 год / Под ред. Черногаевой Г. М. – М.: Институт глобального климата и экологии Росгидромета и РАН, 2019. – 226 с.
2. Hall J. L. Transition metal transporters in plants / Hall J. L., Williams L. E. // *Journal of Experimental Botany*. – 2003. – V. 54(393). – P. 2601–2613.
3. Nagajyoti P. C. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review / Nagajyoti P. C., Lee K. D., Sreekanth T. V. M. // *Environmental Chemistry Letters*. – 2010. – V. 8(3). – P. 199–216.
4. Schützendübel A. Plant responses to abiotic stress: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization / Schützendübel A., Polle A. // *Journal of Experimental Botany*. – 2001. – V. 53. – P. 1351–1365.
5. Sharma S. S. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance / Sharma S. S., Dietz K. J. // *Trends in Plant Science*. – 2009. – V. 14(1). – P. 43–50.
6. Benavides M. P. Cadmium toxicity in plants / Benavides M. P., Gallego S. M., Tomaro M. L. // *Brazilian Journal of Plant Physiology*. – 2005. – V. 17. – P. 21–34.
7. Okamoto O. K. Antioxidant modulation in response to metal-induced oxidative stress in algal chloroplasts / Okamoto O. K., Pinto E., Latorre L. R., Bechara E. J. H., Colepicolo P. // *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. – 2000. – V. 40. – P. 18–24.
8. Panda S. K. Chromium stress in plant / Panda S. K., Choudhury S. // *Brazilian journal of plant physiology*. – 2005. – V. 17. – P. 95–102.
9. Hegedus A. Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress / Hegedus A., Erdei S., Horvath G. // *Plant Science*. – 2001. – V. 160. – P. 1085–1093.
10. Krämer U. Functions and homeostasis of zinc, copper, and nickel in plants / Krämer U., Clemens S. // *Topics in Current Genetics*. – 2005. – V. 14. – P. 215–272.
11. Graedel T. E. Multilevel cycle of anthropogenic copper. / Graedel T. E., Van Beers D., Bertram M., Fuse K., Gordon R. B., Gritsinin A., et al. // *Environmental Science Technology*. – 2004. – V. 38. – P. 1242–1252.
12. Shrivastava A. K. A review of copper pollution and its removal from water bodies by pollution control technologies / Shrivastava A. K. // *Indian Journal of Environmental Protection*. – 2009. – V. 29. – P. 552–560.
13. Гуральчук Ж. З. Механизмы устойчивости растений к тяжелым металлам / Гуральчук Ж. З. // *Физиология и биохимия культурных растений*. – 1994. – Т. 26, № 2. – С. 107–117.
14. Добровольский С. А. О загрязнении участков вдоль автомагистралей г. Москвы тяжелыми металлами / Добровольский С. А. // *Инженерные изыскания*. – 2010. – №10. – С. 52–56.
15. Juknys R. The impacts of heavy metals on oxidative stress and growth of spring barley / Juknys R., Vitkauskaitė G., Račaitė M., Vencloviene J. // *Central European Journal of Biology*. – 2012. – V. 7(2). – P. 299–306.
16. Sgherri C. Early production of activated oxygen species in root apoplast of wheat following copper excess. / Sgherri C., Quartacci M. F., Navari-Izzo F. // *Journal of plant physiology*. – 2007. – V. 164. – P. 1152–1160.
17. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / Murashige T., Skoog F. // *Physiologia Plantarum*. – 1962. – V. 15, № 13. – P. 473–497.
18. Староверов В. В. Клеточная селекция в культуре in vitro льна многолетнего (*Linum perenne* L.) на устойчивость к окислительному стрессу / Староверов В. В., Степанова А. Ю., Терешонок Д. В., Литвинова И. И. // *Плодоводство и ягодоводство*. – 2011. – Т. 26. – С. 230–236.

19. Стальная И. И. Современные методы в биохимии / И. И. Стальная, Т. Г. Гаришвили; Под ред. Ореховича В. Н. – М.: Изд-во «Медицина», 1977. – 392 с.
20. Taddei S. Effect of copper on callus growth and gene expression of in vitro-cultured pith explants of *Nicotiana glauca* / Taddei S., Bernardi R., Salvini M., Pugliesi C., Durante M. // *Plant Biosystems*. – 2007. – V. 141(2). – P. 194–203.
21. Lukatkin A. Effect of copper on pro- and antioxidative reactions in radish (*Raphanus sativus* L.) in vitro and in vivo / Lukatkin A., Egorova I., Michailova I., Malec P., Strzałka K. // *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. – 2014. – V. 28. – P. 80–86.
22. Гладков Е. А. Использование клеточной селекции для получения толерантных к тяжелым металлам газонных трав. / Гладков Е. А., Долгих Ю. И., Гладкова О. В. // *Известия Самарского научного центра РАН*. – 2013. – № 4. – С. 1258–1262.
23. Литвинова И. И. Введение в культуру клеток у растений, используемых в качестве кормовых, лекарственных и декоративных, для получения стрессоустойчивых форм / Литвинова И. И., Гладков Е. А. // *Сельскохозяйственная биология*. – 2012. – № 4. – С. 94–99.

THE RELATIONSHIP BETWEEN COPPER RESISTANCEAS (AN ADVERSE ECOLOGICAL FACTOR) AND OXIDATIVE STRESS IN CALLUSES OF PERENNIAL FLAX (*LINUM PERENNE* L.)

Stepanova A. Yu., Solov'eva A. I., Tashlieva I. I., Gladkov E. A.

*K. A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Moscow, Russian Federation
E-mail: step_ann@mail.ru*

The heavy metal pollution has a negative effect on plants – it inhibits their growth, productivity and significantly reduces their decorative qualities. Recent studies indicate that oxidative stress plays a significant role in cell damage under heavy metal. Indeed, several heavy metals such as Cu, Cr, Fe are redox-active metals producing hydroxyl radicals, which are the most toxic form of ROS (reactive oxygen species), as a result of the Haber-Weiss reaction. Copper is a one of the major environmental pollutants of the environment due to its widespread use in industry and agriculture.

Direct experiments it was shown that copper cause the formation of hydroxyl radicals. However, studies on cross-resistance to heavy metals and oxidative stress have not been conducted. The aim of our work is to study the intensity of oxidative stress development in flax cells cultivated in vitro under the action of copper and to evaluate the possibility of obtaining cell lines that are resistant to both oxidative stress and copper using cell selection.

As an object of study used *Linum perenne* L. cv. "Blue silk". To obtain callus, cotyledons of sterile grown 14-day-old seedlings were placed in a modified MS medium with 2 mg/l of NAA, 4 mg/l of kinetin, 0.1 mg/l of 2.4-D. Evaluating the cell response to stress caused by copper, the callus were transferred on filter paper impregnated with a liquid medium containing $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ with a final Cu^{2+} content of 300 μM , 600 μM , 1000 μM . To analyze the level of oxidative stress induced by Cu treatment in calluses the MDA content was measured. The plant material was incubated at *photoperiod of 16/8 h and the temperature was set to $24 \pm 1^\circ\text{C}$* . To assess the viability used the indicator "growth index", as the difference between the final and initial mass divided by the initial and expressed in % relative to the control, which was taken as 100 %.

The first stage of work was to evaluate the influence of different concentrations of copper on callus growth. It was shown that Cu concentration of 300 μM significantly decreased callus growth (about 60 % compared to the control), which indicates a strong inhibitory effect of this concentration. With increasing Cu content to 600 and 1000 μM , viability was sustained only at 13 % and 5 % of calluses compared to the control, respectively (See Figure 1).

The MDA content in all flax calluses that was grown under Cu stress is higher than in the control. The maximum MDA content on 14-day-growth was observed in a medium containing 300 μM of copper (See Figure 2). Thus, under the influence of heavy metals on flax callus there is an increase in the level of MDA, which indicates the development of oxidative stress. The next stage of the work was the evaluation of cell lines with high activity of SOD for resistance to Cu. The lines with high activity of SOD were selected at 1 μM paraquat as an agent causing oxidative stress. It is shown that the lines selected on the paraquat showed higher resistance to Cu compared to the control calluses.

Thus, oxidative stress plays an important role in the damage of plant cells in the conditions of Cu pollution. Cell lines with higher resistance to oxidative stress caused by paraquat can be the basis for the producing of plants resistant to heavy metal contamination

The paper contains 2 Figures and 23 References

Keywords: *Linum perenne* L., callus, copper, oxidative stress.

References

1. Obzor sostojanija i zagriznenija okruzhajushhej sredy v RF za 2018 god/ Pod red. Chernogaevoj G. M. 226 p. (M.: Institut global'nogo klimata i jekologii Rosgidrometa i RAN, 2019). (In Russian).
2. Hall J. L., Williams L. E. Transition metal transporters in plants, *Journal of Experimental Botany*, **54**(393), 2601 (2003).
3. Nagajyoti P. C., Lee K. D., Sreekanth T. V. M. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review, *Environmental Chemistry Letters*, **8**(3), 199 (2010).
4. Schützendübel A., Polle A. Plant responses to abiotic stress: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization, *Journal of Experimental Botany*, **53**, 1351 (2001).
5. Sharma S. S., Dietz K. J. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance, *Trends in Plant Science*, **14**(1), 43 (2009).
6. Benavides M. P., Gallego S. M., Tomaro M. L. Cadmium toxicity in plants, *Brazilian Journal of Plant Physiology*, **17**, 21 (2005).
7. Okamoto O. K., Pinto E., Latorre L. R., Bechara E. J. H., Colepicolo P. Antioxidant modulation in response to metal-induced oxidative stress in algal chloroplasts, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **40**, 18 (2000).
8. Panda S. K., Choudhury S. Chromium stress in plant, *Brazilian Journal of Plant Physiology*, **17**, 95 (2005).
9. Hegedus A., Erdei S., Horvath G. Comparative studies of H_2O_2 detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress, *Plant Science*, **160**, 1085 (2001).
10. Krämer U., Clemens S. Functions and homeostasis of zinc, copper, and nickel in plants, *Topics in Current Genetics*, **14**, 215 (2005).
11. Graedel T. E., Van Beers D., Bertram M., Fuse K., Gordon R. B., Gritsinin A., et al. Multilevel cycle of anthropogenic copper, *Environmental Science Technology*, **38**, 1242 (2004).
12. Shrivastava A. K. A review of copper pollution and its removal from water bodies by pollution control technologies, *Indian Journal of Environmental Protection*, **29**, 552 (2009).
13. Guralchuk Zh. Z. Mechanisms of Plant Resistance to Heavy Metals, *Physiology and Biochemistry of Cultivated Plants*, **26**, 2, 107 (1994).

14. Dobrovolsky S. A. On the pollution of sections along highways of Moscow with heavy metals, *Engineering Surveys.*, **10**, 52 (2010).
15. Juknys R., Vitkauskaitė G., Račaitė M., Vencloviene J. The impacts of heavy metals on oxidative stress and growth of spring barley, *Central European Journal of Biology*, **7**(2), 299 (2012).
16. Sgherri C., Quartacci M.F., Navari-Izzo F. Early production of activated oxygen species in root apoplast of wheat following copper excess. *Journal of Plant Physiology*, **164**, 1152 (2007).
17. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, **15**(13), 473 (1962).
18. Staroverov V. V., Stepanova A. Yu., Tereshonok D. V., Litvinova I. I. Kletchnaya selektsiya v kul'ture in vitro l'na mnogoletnego (*Linum perenne* L.) na ustoichivost' k okislitel'nomu stressu, *Plodovodstvo i yagodovodstvo*, **26**, 230 (2011) (In Russian).
19. Stal'naya I. D. *Sovremennye metody v biokhimii*. 392 p. (M: Meditsina; 1977) (In Russian)
20. Taddei S., Bernardi R., Salvini M., Pugliesi C., Durante M. Effect of copper on callus growth and gene expression of in vitro-cultured pith explants of *Nicotiana glauca*. *Plant Biosystems*. **141**(2), 194 (2007).
21. Lukatkin A., Egorova I., Michailova I., Malec P., Strzałka K. Effect of copper on pro- and antioxidative reactions in radish (*Raphanus sativus* L.) in vitro and in vivo, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology.*, **28**, 80 (2014).
22. Gladkov E. A., Dolgih Yu. I., Gladkova O. V. Using of cell selection for lawn grass tolerance to heavy metals. *Izvestia of samara scientific center of the Russian academy of sciences*, **4**, 1258 (2013).
23. Litvinova I. I., Gladkov E. A. Introduction to cell culture used for obtaining fodder and decorative plants resistant to stress. *Sel'skokhozyaistvennaya biologia = Agricultural Biology.*, **4**, 94 (2012).

УДК 581.13/8

ОСОБЕННОСТИ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА И УЛЬТРАСТРУКТУРА ТКАНЕЙ *EQUISETUM ARVENSE* L.

Сытников Д. М.¹, Шейко Е. А.²

¹Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, Одесса, Украина

²Медицинская академия имени С. И. Георгиевского (структурное подразделение)

ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», Симферополь,
Республика Крым, Россия

E-mail: sytnikov@list.ru

Изучена динамика содержания растворимых и легкогидролизуемых углеводов, фотосинтетических пигментов в различных органах хвоща полевого (*Equisetum arvense* L.) в онтогенезе, а также ультраструктура его ассимилирующих и запасающих тканей. Наиболее высокое содержание сахаров обнаружено в корневище (15,9 %) в генеративном периоде, а также в нижних ветвях ассимилирующих побегов (21,1 %) в вегетативном периоде развития растений. Относительно высокое содержание сахаров, а также хлорофилла *a* и *b* в ассимилирующих побегах хвоща сопровождается наличием в клетках хлоренхимы групп функционально активных хлоропластов. Установлено, что максимальное количество крахмала накапливалось в корневище (14,0 %) и в клубнях (14,2 %) к концу вегетативного периода, при этом в клетках основной паренхимы корневища хвоща идентифицированы многочисленные амилопласты, содержащие крахмальные зёрна.

Ключевые слова: *Equisetum arvense* L., углеводный обмен, ультраструктура тканей, сахара, крахмал, хлорофилл.

ВВЕДЕНИЕ

Представители рода *Equisetum* характеризуются значительной морфологической и экологической пластичностью, в связи с чем представляют интерес в изучении особенностей распространения пионерной растительности, являются объектом исследований в поиске эффективных средств борьбы с корневищными сорняками, а также в решении задач фармакогнозии. Тем не менее, несмотря на общую биологическую изученность и актуальность практических аспектов использования хвощей, фитохимическая характеристика некоторых представителей рода фрагментарна или отсутствует, при этом не до конца выясненными остаются вопросы физиологии, относящиеся, в частности, к их способности за короткое время эффективно накапливать вегетативную массу и запасные питательные вещества [1–3].

Углеводы составляют 85–90 % веществ, слагающих растительный организм, они являются основным питательным и главным опорным материалом для растительных клеток и тканей [4]. В растениях они выполняют энергетическую, пластическую и регуляторную функции. Последняя касается генеративных процессов, связана с ростом и развитием растений [5]. Углеводный обмен

составляет синтез, накопление и превращение веществ углеродной природы в растительном организме, он сопряжён с белковым, липидным и другими обменами веществ, в связи с чем ему принадлежит ведущая роль в физиологических процессах.

Хвощ полевой, как дикий вид, обладает высокой биологической эффективностью в распределении продуктов фотосинтеза, характеризуется способностью накапливать запасные вещества в наземной части растения, корневище и клубнях [6]. Хвощи характеризуются изменчивостью химического состава в течение года. Например, накопленный за лето хвощом зимующим крахмал превращается в сахара при наступлении низких температур [1]. Во время выхода хвоща полевого из состояния покоя уменьшается число крахмальных зёрен в амилопластах паренхимы корневища и увеличивается количество липидных капель, формирующих характерные скопления [7]. Таким образом, изменения в содержании крахмала могут служить показателем физиологического состояния тканей.

Ранее нами установлена ведущая роль хлоренхимы нижних ветвей вегетативных побегов хвоща полевого в накоплении максимального количества хлорофилла. При этом обсуждалась роль структуры и физиологического состояния фотосинтетического аппарата в способности хвоща полевого эффективно накапливать вегетативную массу и запасные питательные вещества за короткий период активного развития [3].

Цель настоящей работы – изучить содержание и локализацию сахаров, крахмала, хлорофилла и ультраструктуру тканей различных органов хвоща полевого в онтогенезе для выявления особенностей его углеводного обмена.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали растения хвоща полевого (*Equisetum arvense* L.), произрастающего на научно-производственной базе Института ботаники имени Н. Г. Холодного Национальной академии наук Украины «Феофания» (г. Киев) в условиях Северной Лесостепи Украины.

Хвощ полевой – многолетнее травянистое растение. Генеративные (спороносные) побеги появляются ранней весной, на верхушках они несут яйцевидно-цилиндрические стробилы со спорангиями, в которых формируются споры. Эти побеги буровато-розовые, не ветвистые, состоят из 6–7 междоузлий и коротких узлов, от которых отходят расположенные кольцами листья, образующие сросшиеся мутовки с 8–10 чёрно-бурыми зубцами. После спороношения генеративные побеги большей частью отмирают. Вместо них развиваются вегетативные (ассимилирующие) побеги, которые достигают 15–50 см в высоту и состоят из 14–15 междоузлий. Они стерильны, зелёного цвета, шероховатые, с бороздами и цилиндрическими мутовками, образующими влагалища, которые неплотно прилегают и заканчиваются ланцетовидными, заострёнными, чёрно-бурыми, узко-бело-окаймлёнными редуцированными листьями, как правило, не участвующими в процессе фотосинтеза. Зубцевидные листовые пластинки обычно короткие и содержат очень мало хлоренхимы. Ветви первого порядка трёх-четырёхгранные, располагаются мутовчато, со временем, начиная с нижнего яруса,

на них начинают формироваться ветви второго порядка и так далее. Стебли хвоща полевого обладают ярко выраженной метамерией, ассимиляционную функцию здесь выполняют зелёные стебли и ветви. Корневище у хвоща полевого двух типов – горизонтальное и вертикальное, буровато-чёрного цвета, ползущее и членистое, с длинными междоузлиями и короткими узлами, несет на себе листовые влагалища и формирует клубни, которые служат местом отложения запасных веществ, а также органами вегетативного размножения. Поверхность корневищных междоузлий по сравнению с поверхностью надземных междоузлий вегетативных побегов более ровная, её гребни выражены слабо [1, 8, 9].

Фенологические наблюдения за растениями хвоща полевого, произрастающего в естественных условиях, производили по общепринятой методике [10] в период с марта по август (2009–2013 гг.). По их результатам [3] в ходе онтогенеза хвоща нами были чётко выделены: 1) *генеративный период* (спороносные побеги), включающий в себя фазу меристематического побега, фазы закрытого и открытого стробиллов; 2) *вегетативный период*, в котором фазы развития дифференцировали по размеру ассимилирующего побега – 15, 30 и 40 см; 3) *период покоя*, наступающий после отмирания надземной части растения.

Пробы для анализа отбирали в соответствии с указанными выше фазами развития растений. При этом растения были разделены на органы генеративного (стробил, междоузлия, мутовки редуцированных листьев) и вегетативного (ветви первого порядка и междоузлия) побегов, а также на корневище и клубни. Для измерений отбирали средние пробы растительного материала соответствующего органа нескольких рендомизированных растений. Измерения проводили в трёхкратной биологической повторности.

Содержание растворимых и легкогидролизуемых углеводов определяли по общеизвестной методике [11]. Образцы фиксировали в течение 20 мин при 105 °С и высушивали при 60–65 °С в течение 4 ч. Массовую долю сахаров и крахмала вычисляли в процентах к воздушно-сухой массе.

Определение содержания фотосинтетических пигментов производили путём предварительного экстрагирования хлорофилла 96 % этиловым спиртом в течение суток с последующим определением оптической плотности полученных экстрактов на спектрофотометре ПЭ 5400УФ (Россия) при 665 и 649 нм. После определения концентрации хлорофиллов *a* и *b* в экстракте [12], по формуле Wintermans и De Mots (1965) рассчитывали их содержание в исследуемом растительном материале с учётом объема вытяжки и массы пробы [12].

Статистическую обработку полученных данных производили по Доспехову [13]. В таблицах и в тексте представлены %, средние арифметические, стандартные ошибки и НСР. Достоверность разницы значений оценивали, используя 5 % уровень значимости ($P \leq 0,05$).

Изучение структурных особенностей тканей проводили на сканирующем микроскопе JSM-6060 LA (JEOL, Япония). Замороженные при температуре жидкого азота образцы высушивали при температуре –40 °С, в вакууме, затем покрывали слоем золота в ионном напылителе ION Sputer JFC-1100 (JEOL, Япония).

Для исследования ультраструктуры хвоща отбирали фрагменты тканей размером 1 × 2 мм, которые фиксировали 3 %-ным раствором глютарового альдегида («Serva», США) на фосфатном буфере (pH 7,2) в течение 2 ч. Постфиксацию осуществляли 1 %-ным раствором тетроксид осмия при комнатной температуре в течение 3 ч. Материал обезживали восходящими концентрациями этилового спирта по общепринятой методике и заливали смесью (эпон и аралдит) эпоксидных смол («Serva», США) [14]. Ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме LKB-3 (LKB, Швеция) и контрастировали цитратом свинца по Рейнольдсу [15] в течение 7 мин. Срезы тканей исследовали на трансмиссионном электронном микроскопе JEM-1230 (JEOL, Япония).

Размеры клеток и органелл на электронных микрофотографиях определяли при помощи программы UTHSCSA Image Tool 3.0, используя заданную прибором на изображении линейку-шкалу.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе фенологических наблюдений установлено, что рост спороносных побегов в генеративном периоде развития хвоща полевого протекает достаточно медленно, начиная с конца марта – середины апреля. С переходом хвоща к вегетативному периоду, в начале мая, формируются ассимилирующие побеги, достигающие максимального роста в июле.

Исследование растворимых и легкогидролизуемых углеводов в генеративном периоде показало (табл. 1), что максимальное количество сахаров и крахмала содержалось в корневище хвоща полевого в фазу меристематического побега. Относительно высокое содержание углеводов в корневище перед началом периода активного развития растений, очевидно, обусловлено его главной функцией, как запасающего органа. С наступлением фазы закрытого стробила количество углеводов в корневище и в других органах растений хвоща достоверно снижалось. Так, минимальное количество сахаров и крахмала наблюдалось в стробиле и в листьях, при этом количество сахаров во всех органах хвоща достоверно превышало количество крахмала, независимо от фазы развития растений.

Принято считать, что спороносный побег, как правило, не содержит хлорофилла и поэтому не участвует в процессе фотосинтеза [1], а соответственно и в ассимиляции углерода. Ранее нами были обнаружены незначительные количества хлорофилла в стробиле, междоузлиях и листьях на всех фазах развития спороносного побега [3]. Однако, для активного протекания фотосинтетических реакций, что могло бы существенно отразиться на углеводном обмене хвоща, этого явно не достаточно.

В вегетативном периоде развития хвоща полевого содержание сахаров в корневище оставалось стабильным и достоверно снижалось до 7,4 % к воздушно-сухой массе с развитием ассимилирующих побегов (табл. 2). При этом содержание крахмала в корневище по сравнению с генеративным периодом (см. табл. 1) заметно возрастало и оставалось в пределах 13,0–14,0 % %. Содержание растворимых и легкогидролизуемых углеводов в клубнях хвоща полевого было сопоставимо с аналогичными показателями в корневище.

Таблица 1
Содержание растворимых и легкогидролизуемых углеводов у хвоща полевого
(*Equisetum arvense* L.) в генеративном периоде развития,
% к воздушно-сухой массе

Фаза развития	Орган							
	Корневище		Междоузлия		Листья		Стробил	
	сахара	крахмал	сахара	крахмал	сахара	крахмал	сахара	крахмал
Меристематический побег	15,9	12,9	13,3	6,8	10,6	6,2	9,7	7,2
Закрытый стробил	11,0	5,5	10,7	4,1	8,6	3,4	6,5	3,3
НСР _{0,05}	1,7	0,6	1,4	0,9	1,1	0,8	1,1	0,5

Таблица 2
Содержание растворимых и легкогидролизуемых углеводов у хвоща полевого
(*Equisetum arvense* L.) в вегетативном периоде развития,
% к воздушно-сухой массе

Фаза развития побега, см	Корневище		Клубни		Нижняя часть побега (1–6 междоузлия)				Верхняя часть побега (11–15 междоузлия)			
					Междоузлия		Ветви		Междоузлия		Ветви	
	сахара	крахмал	сахара	крахмал	сахара	крахмал	сахара	крахмал	сахара	крахмал	сахара	крахмал
15	12,1	14,0	--	--	8,9	9,5	9,3	8,3	10,6	11,9	7,6	11,3
30	12,2	13,0	--	--	9,4	11,5	10,2	8,1	11,0	12,1	8,6	9,0
40	7,4	13,5	6,5	14,2	7,9	9,5	21,1	7,1	8,9	9,6	11,2	8,4
НСР _{0,05}	1,2	1,5	--	--	1,0	1,1	2,3	0,9	1,0	1,1	1,0	0,9

Примечание: «--» – показатель не определяли.

Из литературы известно [1], что количество крахмала в клетках зависит от сезона года и от местоположения данного участка корневища. Например, у хвоща болотного количество крахмала в корневище уменьшается в начале лета, возрастает

в середине и вновь падает к осени, в связи с образованием зачатков побегов будущего года. Исходя из этого мы приходим к выводу, что снижение количества крахмала в корневище хвоща полевого в генеративном периоде развития связано с развитием спороносных побегов, а относительно высокое содержание крахмала в корневище и клубнях в вегетативном периоде было связано с переходом растений к активному фотосинтезу и запасанию его продуктов в этих подземных органах.

Исследование сахаров в ассимилирующих побегах хвоща показало (см. табл. 2), что максимальное их количество содержится в ветвях нижней части растений (21,1 %). Этот показатель достоверно возрастает в ветвях при последовательном прохождении растениями фаз своего развития от побегов 15 см до побегов 40 см. В междоузлиях количество сахаров находилось в пределах 7,9–11,0 % к воздушно-сухой массе, также отмечалась тенденция несколько повышенного их накопления в верхней части побега. Содержание крахмала в ассимилирующих побегах хвоща полевого начиная от фазы побега 15 см до фазы 40 см находилось в пределах 7,1–12,1 %. При этом, как в междоузлиях, так и в ветвях верхней части побега отмечалось более высокое содержание данного углевода.

Исследование фотосинтетических пигментов показало (табл. 3), что максимальное количество хлорофилла *a* и *b* содержится в ветвях нижней части ассимилирующих побегов (1–6 междоузлие) хвоща полевого. При этом установлено увеличение содержания пигментов в ветвях при последовательном прохождении растениями фаз своего развития от побегов 15 см до побегов 40 см. Полученные данные согласуются с результатами изучения динамики количества сахаров в ветвях ассимилирующих побегов (см. табл. 2) и могут указывать на существование связи между их содержанием и процессами фотосинтеза, обеспечивающихся пигментами.

Таблица 3

Содержание хлорофилла в ветвях ассимилирующих побегов хвоща полевого (*Equisetum arvense* L.), мг/г сырой массы

Фаза развития побега, см	Нижняя часть (1–6 междоузлие)			Верхняя часть (11–15 междоузлие)		
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a/b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a/b</i>
15	0,7 ± 0,03	0,3 ± 0,01	2,3	0,5 ± 0,02	0,2 ± 0,01	2,5
30	1,8 ± 0,09*	0,6 ± 0,03*	3,0	1,2 ± 0,07*	0,4 ± 0,02*	3,0
40	2,0 ± 0,11*	0,7 ± 0,03*	2,9	1,5 ± 0,07*	0,5 ± 0,02*	3,0

Примечание: «*a*» – хлорофилл *a*, «*b*» – хлорофилл *b*; «*» – достоверность рассчитана относительно данных первой фазы развития побега (15 см).

Известно, что основная функциональная роль в фотосистемах принадлежит хлорофиллу *a*, в то время как хлорофилл *b* и каротиноиды выполняют

вспомогательную (расширяют поглощение) и защитную функции. Максимальная эффективность фотосинтетического аппарата нормально развитых растений достигается при соотношении хлорофиллов (a/b) на уровне 2,5–3,0 [16]. В нашем случае соотношение a/b ветвей ассимилирующего побега хвоща было стабильным в различных фазах его развития и находилось в пределах 2,3–3,0 (см. табл. 3), что свидетельствует об отсутствии влияния на растения каких-либо неблагоприятных факторов.

Поверхность корневищных междоузлий хвоща полевого по сравнению с поверхностью надземных междоузлий его вегетативных побегов более ровная, а её гребни выражены слабо. Известно [1], что у корневищ нет устьиц, хлоренхимы и тяжёлой механической ткани такого типа, как в надземных вегетативных побегах. Под эпидермой междоузлия корневища залегают несколько слоев более или менее толстостенных, не одревесневших, но пропитанных жироподобными веществами и кремнезёмом паренхимных клеток, под которыми, в свою очередь, лежат тонкостенные клетки основной паренхимы, содержащие крахмальные зерна.

На микрофотографиях тканей корневища, полученных с помощью сканирующего электронного микроскопа, видны сферические крахмальные зерна (рис. 1, А). Изучение ультраструктуры тканей хвоща полевого, полученных на трансмиссионном электронном микроскопе, показало, что в фазу молодых ассимилирующих побегов (15 см) клетки основной паренхимы корневища содержали многочисленные амилопласты, заполненные крахмальными зёрнами, липидные капли и митохондрии с хорошо развитой системой крист (см. рис. 1, Б и В). Крахмальные зёрна расположены в амилопластах, по одному в пластиде. Таким образом, полученные микрофотографии иллюстрируют данные по высокому содержанию крахмала в корневище хвоща полевого на данном этапе развития, представленные в табл. 2.

Поскольку листья, как фотосинтезирующие органы, у ассимилирующих побегов хвоща полевого редуцированы, их функцию выполняют междоузлия и ветви. Активно фотосинтезирующая ткань (хлоренхима) подстилает в первую очередь те участки эпидермы побегов, в которых находятся устьица. Ранее нами было установлено [3], что практически вся поверхность боковых рёбер изученных ветвей хвоща плотно усеяна устьицами, которые анатомически расположены над хлоренхимой. Анализ микрофотографий ультраструктуры клеток ассимилирующих побегов хвоща полевого, полученных на трансмиссионном электронном микроскопе, показал (рис. 2), что клетки хлоренхимы междоузлия также были в функционально активном состоянии. Так, здесь нами были идентифицированы группы фотосинтетически активных хлоропластов и митохондрий.

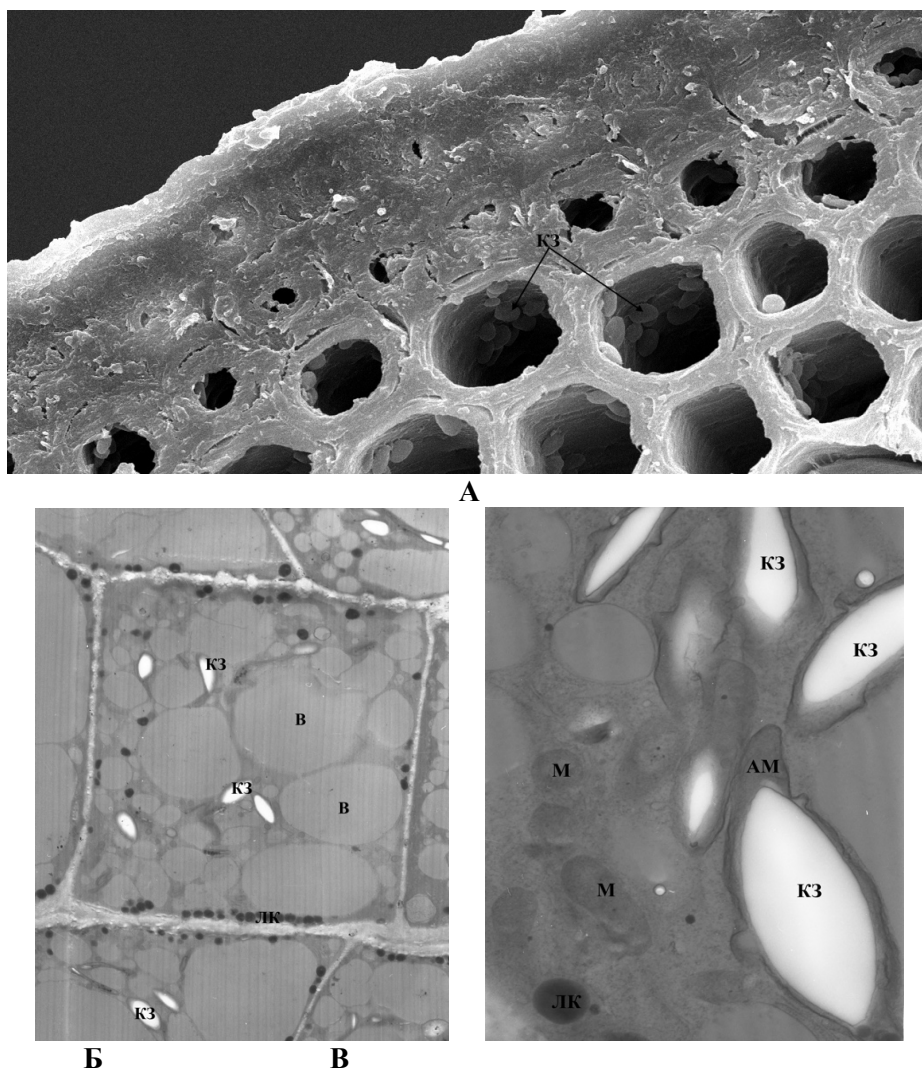


Рис. 1. Локализация крахмала в корневище хвоща полевого (*Equisetum arvense* L.) в вегетативном периоде развития: А – паренхима (увеличение – 750х); Б – клетка паренхимы (увеличение – 2000х); В – фрагмент клетки паренхимы, (увеличение – 15000х).

Обозначения: АМ – амилопласт, КЗ – крахмальные зёрна, ЛК – липидные капли, В – вакуоли, М – митохондрии.

Хлоропласты здесь имели форму утолщённого веретена диаметром 4–5 мкм. В клетке содержалось 5–15 хлоропластов, в них прослеживались система тиллакоидных мембран, мелкозернистая строма и электронноплотный матрикс. Их внутренняя мембранная система была расположена в периферических слоях

стромы, основной объём хлоропластов был заполнен крахмальными зёрнами простого строения, в количестве 1–2 штуки (см. рис. 2).

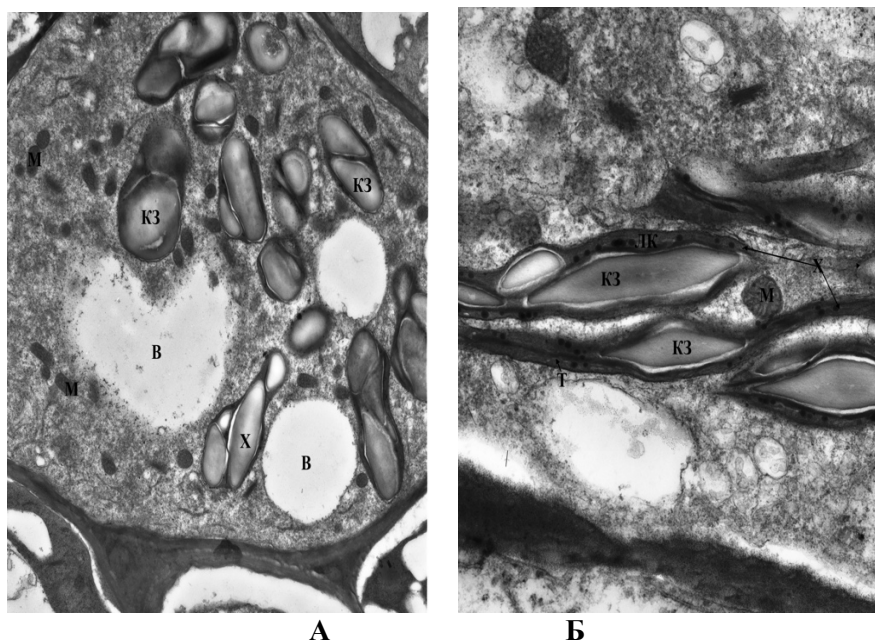


Рис. 2. Ультраструктура клеток междоузлия ассимилирующего побега (фаза 15 см) хвоща полевого, *Equisetum arvense* L.: А (увеличение – 3000х), Б (увеличение – 8000х). Обозначения: КЗ – крахмальные зёрна, Х – хлоропласты, В – вакуоли, Т – тиллакоиды, ЛК – липидные капли, М – митохондрии.

Крахмальные зёрна хлоропластов – временные хранилища продуктов фотосинтеза. Хлоропласты верхних, интенсивно растущих междоузлий (11–15) молодых ассимилирующих побегов (15 см), как правило, содержали несколько больше крахмальных зёрен на единицу площади, чем в нижней части растения (1–6 междоузлия). Следует отметить, что анализ содержания крахмала в ассимилирующих побегах (15 см) хвоща полевого указывает также на тенденцию повышенного его накопления в междоузлиях верхней части растения (см. табл. 2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Изменение содержания растворимых и легкогидролизуемых углеводов в различных органах хвоща полевого зависит от периода онтогенеза и фазы развития растения. Наиболее высокое содержание сахаров обнаружено в корневище (15,9 %) в генеративном периоде (фаза меристематического побега), а также в нижних ветвях (21,1 %) ассимилирующих побегов (фаза 40 см) в вегетативном периоде развития. Максимальное количество крахмала накапливалось в корневище (14,0 %), а также в клубнях (14,2 %) к концу вегетативного периода.

2. В стробиле и в листьях спороносного побега хвоща полевого содержится минимальное количество сахаров и крахмала. При этом генеративный побег содержит незначительные количества хлорофилла, в связи с чем не принимает активного участия в процессе фотосинтеза, что могло бы существенно отразиться на углеводном обмене растений.
3. В генеративном периоде развития хвоща полевого количество крахмала в корневище заметно снижается, что связано с развитием спороносных побегов. Относительно высокое содержание крахмала в корневище и клубнях в вегетативном периоде развития обусловлено переходом растений к активному фотосинтезу с последующим запасанием его продуктов в этих подземных органах. При этом клетки основной паренхимы корневища хвоща в фазу молодых ассимилирующих побегов (15 см) содержат многочисленные амилопласты с крахмальными зёрнами.
4. Относительно высокое содержание сахаров, а также фотосинтетических пигментов в ассимилирующих побегах хвоща полевого сопровождается наличием в клетках хлоренхимы групп функционально активных хлоропластов, содержащих крахмальные зёрна.

Список литературы

1. Жизнь растений: [в 6-ти томах] / гл. ред.: Ал. А. Фёдоров – М.: Просвещение, 1974–1981. – Т. 4: Мхи. Плауны. Хвощи. Папоротники. Голосеменные растения / [Тахтаджан А. Л., Лазаренко А. С., Грушвицкий И. В. и др.]; под. ред. И. В. Грушвицкого и С. Г. Жилина, 1978. – 447 с.
2. Коломиец Н. Э. Сравнительное исследование химического состава видов рода хвощ флоры Сибири / Н. Э. Коломиец, Г. И. Калинкина // Химия растительного сырья. – 2010. – № 1. – С. 149–154.
3. Сытников Д. М. Фотосинтетические пигменты и онтогенез *Equisetum arvense* L. / Д. М. Сытников, Л. М. Бабенко, Н. Н. Щербатюк // Вестник Одесского национального университета. Серия: Биология. – 2013. – Т. 18, Вып. 2 (31). – С. 50–60.
4. Кретович В. Л. Основы биохимии растений: учебник [для гос. унив. и технолог. инст.] / В. Л. Кретович. – М.: Высшая школа, 1971. – 464 с.
5. Киризий Д. А. Фотосинтез и рост растений в аспекте донорно-акцепторных отношений / Д. А. Киризий. – Киев: Логос, 2004. – 192 с.
6. Marshall G. Growth and Development of Field Horsetail (*Equisetum arvense* L.) / G. Marshall // Weed Science. – 1986. – Vol. 34. – P. 271–275.
7. Бабенко Л. М. Активність ліпоксигенази й ультраструктурна будова корневища спороносного і вегетативного пагонів *Equisetum arvense* L. / Л. М. Бабенко, М. М. Щербатюк, І. В. Косаківська // Біологічні студії. – 2015. – Т. 9, № 1. – 153–162.
8. Кучерява Л. Ф. Систематика вищих рослин. I. Архегоніати / Л. Ф. Кучерява, Ю. О. Войтюк, В. А. Нечитайло. – Київ: Фітосоціоцентр, 1997. – 136 с.
9. Флора УССР / Голов. ред. акад. О. В. Фомін. – Т. 1. – Київ: Видавництво АН УССР, 1936. – С. 110–113.
10. Бейдеман И. Н. Методика изучения фенологии растений и растительных сообществ / И. Н. Бейдеман. – Новосибирск: Наука, 1974. – 156 с.
11. Методы биохимического исследования растений / А. И. Ермаков, В. В. Арасимович, Н. П. Ярош [и др.]; Под ред. А. И. Ермакова. – 3-е изд., перераб. и доп. – Л.: Агропромиздат, Ленингр. отд-ние, 1989. – 430 с.
12. Мусієнко М. М. Спектрофотометричні методи в практиці фізіології, біохімії та екології рослин / М. М. Мусієнко, Т. В. Паршикова, П. С. Славний. – Київ: Фітосоціоцентр, 2001. – 200 с.
13. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований) / Б. А. Доспехов. – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.

14. Фурст Г. Г. Методы анатомо-гистохимического исследования растительных тканей / Г. Г. Фурст. – М.: Наука, 1979. – 155 с.
15. Гайер Г. Электронная гистохимия / Г. Гайер. – М.: Мир, 1974. – 488 с.
16. Шлык А. А. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев / А. А. Шлык // Биохимические методы в физиологии растений. – М.: Наука, 1975. – С. 154–170.

FEATURES OF CARBOHYDRATE METABOLISM AND TISSUE ULTRASTRUCTURE OF *EQUISETUM ARVENSE* L.

Sytnikov D. M.¹, Sheiko E. A.²

¹*Odessa I. I. Mechnikov National University, Odessa, Ukraine*

²*V. I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Crimea, Russia*

E-mail: sytnikov@list.ru

The dynamics of the content of soluble and easily-hydrolyzing carbohydrates, photosynthetic pigments in different organs of the field horsetail (*Equisetum arvense* L.) in ontogenesis, as well as the ultrastructure of its assimilating and storage tissues have been investigated.

Phenological observations of the field horsetail plants, which grew under natural conditions, were carried out in the period from March to August 2009–2013.

The content of soluble and easily-hydrolyzing carbohydrates was determined by the conventional method and calculating the mass fraction of sugars and starch as a percentage of the air-dry mass. The content of photosynthetic pigments was determined by extraction of chlorophyll with 96 % ethanol followed by determination of the optical density of the extracts and calculation of pigment concentration as a mg/g of crude mass. JSM-6060 LA scanning microscope and JEM-1230 transmission electron microscope (JEOL, Japan) were used for the morphological and ultrastructural analysis of horsetail tissues.

The highest sugar content was found in the rhizomes (15,9 %) in the generative period, as well as in the lower branches of the assimilating shoots (21,1 %) in the vegetative period of plant development. It was shown that the maximum amount of starch accumulated in the rhizome (14,0 %) as well as in the tubers (14,2 %) by the end of the growing season.

The relatively high content of sugars and chlorophyll *a* and *b* in the assimilating shoots of the field horsetail is accompanied by the presence in the cells of chlorenchyma the groups of functionally active chloroplasts. The increase of starch content in the rhizomes and tubers during the vegetative period of horsetail development is conditioned by the transition of plants to active photosynthesis with the subsequent storage of its products in these underground organs. At the same time in the cells of the rhizome main parenchyma were identified numerous amyloplasts containing starch grains.

Keywords: *Equisetum arvense* L., carbohydrate metabolism, ultrastructure of tissues, sugars, starch, chlorophyll.

References

1. *Plant life*, Ed.: Al. A. Fedorov, **4**, 447 p. (Moscow: Prosveshchenie, 1978). (in Russ.).
2. Kolomiets N. E., Kalinkina G. I., Comparative study of the chemical composition of species of the genus Horsetail of Siberian flora, *Khimiya rastitelnogo syr'ya*, **1**, 149 (2010). (in Russ.).
3. Sytnikov D. M., Babenko L. M., Shcherbatyuk N. N., Photosynthetic pigments and ontogenesis *Equisetum arvense* L., *Vestnik Odesskogo universiteta. Seriya: Biologiya*, **18**, 2 (31), 50 (2013). (in Russ.).
4. Kretovich V. L., *Fundamentals of plant biochemistry: textbook*, 464 p. (Moscow: Vysshaya shkola, 1971). (in Russ.).
5. Kiriziy D. A., Photosynthesis and plant growth in the aspect of source-sink relations, 192 p. (Kiev: Logos, 2004). (in Russ.).
6. Marshall G., Growth and Development of Field Horsetail (*Equisetum arvense* L.), *Weed Science*, **34**, 271 (1986).
7. Babenko L. M., Shcherbatyuk M. M., Kosakivska I. V., Lipoxygenase activity and rhizomes ultrastructure of vegetative and generative shoots of *Equisetum arvense* L., *Studia Biologica*, **9**, (1), 153 (2015). (in Ukr.).
8. Kucheryava L. F., Voytyuk Yu. O., Nechitaylo V. A., *Systematics of higher plants. I. Archegoniats*, 136 p. (Kiev: Fitosotsiotsentr, 1997). (in Ukr.).
9. *Flora USSR*, Ed.: O. V. Fomin, **1**, 110 (Kiev: Vydavnytstvo AN USRR, 1936). (in Ukr.).
10. Baydeman I. N., *Methodology for studying the phenology of plants and plant communities*, 156 p. (Novosibirsk: Nauka, 1974). (in Russ.).
11. *Methods of biochemical research of plants*, Ed.: A. I. Ermakov, 430 p. (Leningrad: Agropromizdat, Leningr. otd-nie, 1989). (in Russ.).
12. Musienko M. M., Parshykova T. V., Slavnyi P. S., *Spectrophotometric methods in the practice of plant physiology, biochemistry and ecology*, 200 p. (Kiev: Fitosotsiotsentr, 2001). (in Ukr.).
13. Dospekhov B. A., *Field experiment methodology (with the basics of statistical processing of research results)*, 351 p. (Moscow: Agropromizdat, 1985). (in Russ.).
14. Furst G. G., *Methods of anatomical and histochemical study of plant tissues*, 155 p. (Moscow: Nauka, 1979). (in Russ.).
15. Gayer G., *Electronic histochemistry*, 488 p. (Moscow: Mir, 1974). (in Russ.).
16. Shlyk A. A., *Biochemical methods in plant physiology*, 154–170 pp. (Moscow: Nauka, 1975). (in Russ.).

УДК 591.182:615.356:57.084

ЭФФЕКТЫ ДЛИТЕЛЬНО ВВОДИМОЙ α -ЛИПОВОЙ КИСЛОТЫ НА НЕРВНО-МЫШЕЧНЫЙ АППАРАТ В МОДЕЛЬНЫХ ЭКСПЕРИМЕНТАХ НА ЖИВОТНЫХ

Труш В. В.¹, Соболев В. И.²

¹ГОУ ВПО «Донецкий национальный университет», Донецк, Украина

²Гуманитарно-педагогическая академия (филиал) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», Ялта, Республика Крым, Россия
E-mail: ver.trush@yandex.ru

В экспериментах на наркотизированных половозрелых крысах-самках с помощью электрофизиологических методов исследовали влияние α -липоевой кислоты (α -ЛК, «Берлитион 600», BERLIN-CHEMIE, Германия), вводимой в умеренной фармакологической дозе (35 мг/кг) на протяжении 10, 30 и 60 дней (10 α -ЛК-, 30 α -ЛК-, 60 α -ЛК-группы), на функциональные параметры скелетной мышцы смешанного типа с преобладанием гликолитических волокон (*m. tibialis anterior*). Установлено, что введение α -ЛК в животный организм привело к повышению ($p < 0,05$ в сравнении с контролем) амплитуды М-ответов мышцы (на 135–130 % спустя 10–60 дней введения) без значимого изменения их длительности, а также увеличению спустя 30–60 дней введения препарата ($p < 0,05$ в сравнении с контролем) количества активируемых двигательных единиц (на 78–109 %) и массы мышцы (на 10–18 %), что косвенно свидетельствует в пользу возможных улучшения синхронизации возбуждения в мышце, увеличения амплитуды потенциала действия мышечных волокон и их гипертрофии. α -ЛК позитивно отразилась на сократительной функции мышцы, на что указывают увеличение в сравнении с контролем ($p < 0,05$) скорости расслабления при одиночном сокращении (на 23–34 % в 10 α -ЛК - 60 α -ЛК-группах), амплитуды одиночных сокращений (на 24–29 % в 30 α -ЛК - 60 α -ЛК-группах) и скорости тетанического сокращения (на 204–379 % в 10 α -ЛК - 60 α -ЛК-группах). Длительное введение α -ЛК в животный организм обусловило удлинение в сравнении с контролем ($p < 0,05$) периода максимальной (на 50–101 % у животных 30 α -ЛК - 60 α -ЛК-групп) и субмаксимальной (на 53 % у особей 60 α -ЛК-группы) работоспособности мышцы, а также более высокую в сравнении с контролем устойчивость мышцы к утомлению и большую скорость ее восстановления после утомления.

Ключевые слова: скелетная мышца, антиоксиданты, α -липоевая кислота, крысы.

ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия в клинической и спортивной медицине возрос интерес к метаботропным препаратам, способным не только корректировать обменные нарушения в организме, но и облегчать течение ряда патологических процессов, замедлять развитие нейродегенеративных заболеваний, а также повышать функциональные возможности скелетных мышц (СМ) и их устойчивость к физическим нагрузкам. Одним из таких препаратов является α -липоевая кислота (α -ЛК), обладающая широким спектром действия.

α -ЛК – условно незаменимая кислота жирного ряда, которая в норме синтезируется в печени и других тканях, но при различных патологических состояниях синтез ее нарушается [1]. Первоначально была установлена способность α -ЛК выступать кофактором для митохондриальных ферментов (дигидролипоилацетилтрансферазы, α -кетоглутаратдегидрогеназы и декарбоксилазы α -кетокислот с разветвленной цепью) и оказывать влияние на активность других ферментов энергетического обмена [2]. Позднее были обнаружены мощные антиоксидантные свойства α -ЛК благодаря наличию двух тиоловых групп и способности связывать радикалы и свободные ионы железа [3]. Кроме того, она взаимодействует с другими антиоксидантами, участвует в рециклировании глутатиона, витаминов Е и С, тем самым поддерживая водный и липидный антиоксидантный статус клеток [4].

Дефицит α -ЛК в животном организме, вызванный нарушением экспрессии α -ЛК-синтазы вследствие генных аномалий, сахарного диабета (СД) II типа или под действием фактора некроза опухолей α (ФНО- α), приводит к снижению активности пируватдегидрогеназного комплекса и ослаблению окисления пирувата, лактацидозу, мышечной гипотонии, повышению уровня глицина в плазме и моче, неонатальной эпилепсии [5], а также общему нарушению антиоксидантной защиты в клетках, что предопределяет усиление воспаления, инсулинорезистентности и митохондриальной дисфункции [6].

α -ЛК обладает липотропной активностью, обусловленной ее способностью активировать образование коэнзима А, облегчать перенос ацетата и жирных кислот из цитозоля в митохондрии, ускорять окисление жирных кислот [7], что предопределяет ее мембранопротективный и антиатерогенный эффекты. Доказано положительное влияние α -ЛК на эндотелий сосудов, обусловленное ослаблением под ее влиянием воспалительных [8] и тромботических [9] механизмов повреждения сосудистой стенки, а также подавлением агрегации тромбоцитов, индуцированной арахидоновой кислотой [10], что может оказаться полезным в профилактике сердечно-сосудистых патологий, в том числе инсультов и инфарктов.

Установлена способность α -ЛК уменьшать накопление жиров в мышечной ткани при высококалорийной диете и предотвращать развитие ожирения [11], что может отчасти достигаться за счет снижения экспрессии генов, кодирующих ферменты липогенеза [12], активации АМФзависимой протеинкиназы (АМПК) и АМПК-независимых путей, предопределяющих уменьшение липогенеза в печени и накопления липидов в СМ и других периферических тканях [13], а также ослабление дифференцировки адипоцитов и усиление их АМПК-зависимой аутофагии [14]. Повышение активности АМПК в скелетных мышечных волокнах (МВ) снижает накопление триглицеридов и увеличивает окисление жирных кислот в них, а также усиливает инсулин-индуцированное поглощение ими глюкозы, что предопределяет повышение эффективности инсулиновых влияний на МВ [15] и является весьма полезным при СД. Кроме того, АМПК способствует образованию 1- α коактиватора γ -рецептора, активируемого пролифератором пероксисом (PGC-1 α), который, в свою очередь, стимулирует образование новых митохондрий в клетках [16]. Все эти эффекты α -ЛК обуславливают ее энерготропное,

антигипоксическое, инсулиноблегающее и антидиабетическое действие.

В исследованиях *in vitro* была установлена способность α -ЛК снижать активность индуцибельной NO-синтазы, предопределяющей образование большого количества NO внутри клеток, пероксинитритный стресс и их гибель [17], и усиливать экспрессию эндотелиальной NO-синтазы [18], обуславливающей вазодилатацию местных сосудов и улучшение органного кровотока [19]. Благодаря отмеченным эффектам на систему оксида азота α -ЛК очевидно способна оказывать органопротекторное действие при хронических дисфункциях различных органов [20].

В ряде модельных экспериментов на животных и клинических наблюдениях на людях доказана эффективность α -ЛК в оптимизации течения черепно-мозговых травм [21], острых и хронических расстройств мозгового кровообращения [22], компенсации и замедлении развития различных нейродегенеративных заболеваний, в том числе болезни Альцгеймера [23], болезни Паркинсона [24], бокового амиотрофического склероза [25]. Установлена способность α -ЛК оказывать позитивное влияние не только на центральную, но и на периферическую нервную систему, в частности, повышать выживаемость шванновских клеток, от которых зависит восстановление оболочки периферических нервов [26], угнетать апоптоз нейронов и глии путем ингибирования активности каспаз 3 и 9 [27].

Наконец, в ряде наблюдений на людях и модельных экспериментах на животных показана эффективность α -ЛК в предотвращении мышечных патологий, вызванных различными факторами. В частности, доказана эффективность α -ЛК в улучшении функционального состояния СМ и переносимости физической нагрузки при метаболической миопатии, обусловленной патологиями дыхательной цепи митохондрий и путей накопления гликогена [28], предотвращении атрофии мышц, вызванной 3-недельной разгрузкой задних конечностей, путем активации митохондриального биогенеза и уменьшения окислительного стресса [29], нивелировании снижения мышечной массы и площади поперечного сечения МВ при СД II типа в результате ингибирования экспрессии миогенина и миостатина [30], защите МВ от ишемического повреждения, индуцированного ишемией-реперфузией, путем снижения продукции ФНО- α [31].

α -ЛК оказалась также эффективной в ослаблении повреждений МВ, вызванных старением. В частности, в литературе имеются сообщения о способности α -ЛК уменьшать выраженность изменений в МВ, типичных для окислительного стресса и старения, путем повышения активности эндогенных антиоксидантных ферментов в них и уменьшения экспрессии провоспалительных агентов [32], поддерживать целостность митохондриальных мембран МВ у старых животных, что предотвращает высвобождение из них в цитозоль цитохрома с и фермента р-53 и индуцированные ими активацию каспазы 3 и протеолиз миофибрилл, а также апоптоз МВ [33].

Установлена эффективность α -ЛК в защите МВ от повреждений, вызванных тяжелыми физическими нагрузками, путем ослабления окислительного стресса [34], повышении устойчивости СМ к истощающим физическим нагрузкам, в том числе в результате меньшей степени накопления активных форм кислорода и менее

выраженного ацидоза после их выполнения [35].

Вместе с тем, не все специалисты признают способность α -ЛК оказывать позитивное влияние на организм и улучшать функциональные параметры скелетной мускулатуры. Так, некоторые авторы [36] свидетельствуют в пользу ослабления под действием α -ЛК активности пути mTOR/p70S6 в МВ, что предопределяет ослабление синтеза белка в них. В то же время в литературе встречаются и противоположные сообщения [37] об усилении синтеза белка в икроножной мышце животных под действием α -ЛК (в дозе 50 мг/кг). В исследованиях Strobel N.A. и соавт. [38], выполненных *in vivo*, показано, что прием антиоксидантов (α -ЛК и витамина Е) приводил к снижению экспрессии PGC-1 α , цитохром-с-оксидазы IV и активности цитрат-синтазы как у нетренированных, так и у тренированных животных, что свидетельствует в пользу подавления биогенеза митохондрий в СМ независимо от состояния тренировки. Эти результаты противоречат данным других авторов [36, 39], наблюдавших повышение экспрессии PGC-1 α и обусловленное этим усиление биогенеза митохондрий под действием α -ЛК *in vitro* и *in vivo*.

Некоторые специалисты указывают в пользу зависимости эффектов α -ЛК на структуры организма от ее дозы, возраста животных и типа ткани. Так, в исследованиях на мышцах установлено, что α -ЛК в малых дозах (10 мг/кг) может оказывать прооксидантное действие, тогда как в высоких (100 мг/кг) более выражено ее антиоксидантное действие [40]. В то же время в работе других авторов [41], напротив, было обнаружено прооксидантное действие высоких доз α -ЛК (100 мг/кг/день, в течение 14 дней) в тканях старых крыс, которое зависело от измененного гомеостаза селена и марганца. Kayali R. и соавт. [42] считают, что прооксидантное действие α -ЛК зависит не только от дозы препарата, но и от постмитотического типа ткани и свидетельствуют, в частности, в пользу усиления оксидативного стресса в мозге старых крыс, получавших α -ЛК, но при этом отсутствии выраженных различий в скелетной мышечной ткани старых животных, получавших и не получавших α -ЛК. В связи с этим в литературе высказывается мнение о двойственном действии α -ЛК на оксидативный стресс, что ставит под сомнение безопасность ее применения [43]. И, в частности, в исследованиях Kim J. I. и соавт. [44] получен факт гибели клеток вследствие повышения концентрации активных форм кислорода в них под действием α -ЛК, что дает авторам основание рассматривать α -ЛК в качестве возможного средства противоопухолевой защиты.

В литературе встречаются и сообщения, согласно которым позитивные эффекты α -ЛК на различные ткани организма проявляются только при определенных патологиях и состояниях, в том числе обуславливающих нарушение антиоксидантного статуса клеток, и фактически не выражены в норме. Так, в исследованиях Saengsirisuwan V. и соавт. [45] показано, что α -ЛК (30 мг/кг/день, в течение 6 недель) повышает потребление СМ глюкозы из крови только у тучных крыс линии Цукер, проявляющих инсулинорезистентность, и не влияет на поглощение глюкозы из крови у чувствительных к инсулину худых крыс этой линии. Согласно данным Rossman M. J. и соавт. [46], прием антиоксидантного

коктейля, включающего α -ЛК, обусловил снижение содержания свободных радикалов в крови больных хронической обструктивной болезнью легких только у людей с исходно высоким их содержанием, но это снижение содержания свободных радикалов существенно не влияло на выносливость и утомляемость четырехглавой мышцы бедра. В других исследованиях на молодых и пожилых добровольцах [47] установлено, что α -ЛК, вводимая в комплексе с витаминами С и Е, предопределяла улучшение перфузии голени и окислительной способности мышц во время упражнений только у пожилых людей и не оказывала существенного влияния на гемодинамику у молодых. Авторы предполагают, что α -ЛК оказывается эффективной в плане улучшения метаболического резерва СМ только у пожилых людей, для которых характерно нарушение окислительного потенциала.

Иными словами, согласно мнению некоторых исследователей, позитивные эффекты α -ЛК могут проявляться только под действием определенных ее доз, выражены не во всех тканях и реализуются только при наличии определенных патологий, в том числе в случае исходно нарушенного антиоксидантного статуса клеток.

В связи с противоречивыми данными относительно эффектов α -ЛК на мышечную систему представляет интерес выяснить характер влияния длительного ее введения на функциональное состояние нервно-мышечного аппарата. В связи с этим *целью настоящей работы* явилось изучение в экспериментах на животных функциональных параметров СМ смешанного типа с преобладанием гликолитических волокон (*m. tibialis anterior*), составляющей большинство в мышечном аппарате млекопитающих, в динамике введения α -ЛК в умеренной фармакологической дозе (35 мг/кг) на протяжении от 10 до 60 дней.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все эксперименты выполнены в соответствии с «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [48]. Животные содержались в помещении кафедры физиологии человека и животных Донецкого национального университета с температурой воздуха 22 °С и 12-часовым циклом свет/темнота, имели свободный доступ к воде и пище. Протокол эксперимента, содержание животных и выведение их из опыта были составлены в соответствии с Европейской конвенцией о защите животных, используемых в эксперименте (директива 86/609/ЕЕС).

Исследования проводились на 40 половозрелых молодых крысах-самках 4–5-ти месячного возраста с исходной массой тела 190–200 г. Животные были первоначально случайным образом разделены на 2 группы: контрольную (n=10, интактная, не подвергалась никаким воздействиям, К-группа) и опытную (n=30, животные получали α -липоевую кислоту, α -ЛК-группа). α -ЛК (торговая марка «Берлитион 600», BERLIN-CHEMIE, Германия) вводили ежедневно в дозе 35 мг/кг, подкожно на протяжении 10, 30 и 60 дней. Таким образом, опытная группа была в последующем разделена на 3 подгруппы (по 10 животных в каждой) в зависимости от количества полученных инъекций α -ЛК: 10 α -ЛК-, 30 α -ЛК- и 60 α -

ЛК-группы, что позволило нам исследовать функциональное состояние мышцы в динамике введения препарата.

По окончании сроков введения α -ЛК на наркотизированных животных (тиопентал натрия, 100 мг/кг, внутривенно) проводили острый опыт, в ходе которого изучали электрофизиологические и эргометрические параметры передней большеберцовой мышцы с помощью экспериментальной установки, включающей 3 канала: канал электростимулятора (использовался для электрического раздражения малоберцового нерва), электромиографический (предназначался для регистрации М-ответов мышцы) и эргометрический (служил для измерения высоты, на которую поднимается груз во время сокращения мышцы с грузом).

Канал электростимулятора представлен собственно электростимулятором (построен на основе функционального генератора ICL8038CCDP), оптронной гальванической развязкой и биполярными игольчатыми стальными электродами с межэлектродным расстоянием 1 мм. Электромиографический канал представлен отводящими биполярными игольчатыми стальными электродами (с межэлектродным расстоянием 1 мм) и электромиографическим биоусилителем (построен на основе измерительного усилителя INA118). Эргометрический канал включал потенциометрический датчик ПТП-1 с усилителем. Все каналы были связаны с регистрирующим устройством – запоминающим цифровым осциллографом Tektronix (TDS2004C).

Ход опыта был следующим. У наркотизированного животного в области бедра препаровали малоберцовый нерв и на расстоянии 1 см проксимальнее коленного сустава подвешивали под него раздражающие электроды. Стопу задней лапки животного крепили зажимом, на уровне большого пальца затягивали лигатуру, соединенную с потенциометрическим датчиком, в среднюю часть передней большеберцовой мышцы вводили отводящие игольчатые электроды.

Вначале регистрировали одиночный М-ответ мышцы, индуцированный раздражением малоберцового нерва одиночными сверхпороговыми электрическими импульсами (длительность – 150 мкс каждый, частота – 0,2 имп/с, сила тока – 500 мкА). На основании записей одиночных М-ответов мышцы определяли их латентный период, амплитуду и длительность.

Затем путем плавного (в течение 4 с) увеличения силы электрического раздражения от подпороговой до сверхпороговой (от 0,01 до 2 В) при частоте 10 имп/с записывали серию из сорока М-ответов мышцы. На основании процентного изменения амплитуды максимального М-ответа относительно амплитуды минимального определяли приблизительное количество активируемых двигательных единиц (ДЕ) мышцы (методика Galea V. [49]).

После этого, раздражая малоберцовый нерв с частотой 4 имп/с сверхпороговыми электрическими импульсами (длительность – 150 мкс каждый, сила тока – 500 мкА), регистрировали в течение 5 с серию одиночных сокращений мышцы с внешней нагрузкой 20 г. На основании полученных записей определяли некоторые параметры одиночного сокращения мышцы: амплитуду, латентный период, длительность фаз укорочения и расслабления.

На следующем этапе мышца выполняла утомляющую работу (УР) в режиме

гладкого тетануса с внешней нагрузкой 70 г вплоть до полного расслабления на фоне продолжающейся электрической стимуляции. Тетаническое сокращение мышцы, как и в предыдущем случае, индуцировали путем раздражения сверхпороговым электрическим током малоберцового нерва (70 имп/с, длительность импульсов – 0,5 мс, сила тока – 1000 мкА). На основании полученных записей определяли максимальную амплитуду тетанического сокращения мышцы, скорость сокращения, продолжительность удержания амплитуды сокращения на максимальном уровне (период максимальной работоспособности) и до момента полурасслабления (период субмаксимальной работоспособности).

После выполнения мышцей УР вновь регистрировали серию одиночных сокращений мышцы при раздражении малоберцового нерва с частотой 4 имп/с, серию М-ответов при раздражении малоберцового нерва стимулами нарастающей амплитуды (от 0,01 до 2 В) и одиночный М-ответ мышцы при раздражении малоберцового нерва с частотой 0,2 имп/с. На основании изменения параметров М-ответа и одиночных сокращений мышцы после выполнения УР относительно соответствующих исходных значений судили об утомляемости нервно-мышечного аппарата у животных разных групп.

По окончании острого опыта в условиях глубокого наркоза проводили эвтаназию животных путем введения летальной дозы (300 мг/кг) тиопентала натрия.

Статистическая обработка

Полученные экспериментальные данные обрабатывали с использованием t-критерия Стьюдента, предварительно убедившись в том, что распределение значений в исследуемых вариационных рядах близко к нормальному (W-тест Шапиро-Уилка, Statistica, 7.0), и F-статистики на основании проверки нулевой и альтернативной гипотез. Значения $p < 0,05$ рассматривали как статистически достоверные. Исследуемые параметры выражали в виде «среднее $\pm$ стандартная ошибка».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние α -липоевой кислоты на электрофизиологические параметры мышцы. Введение α -ЛК обуславливало увеличение амплитуды М-ответов мышцы без значимого изменения их длительности. Так, у животных 10 α -ЛК - 60 α -ЛК-групп амплитуда М-волны превосходила контрольное значение на 135–130 % ($p < 0,05$, см. табл. 1). Наблюдаемый факт может быть обусловлен увеличением степени синхронизации возбуждения МВ, амплитуды их потенциала действия и возможной их гипертрофией. Вместе с тем, значимое относительно контроля увеличение массы мышцы наблюдалось только спустя 30–60 дней введения α -ЛК (см. табл. 2). Кроме того, именно спустя 30–60 дней применения α -ЛК наблюдалось значимое относительно контроля увеличение количества активируемых ДЕ мышцы ($p < 0,05$, см. табл. 2), что, наряду с увеличением ее массы, косвенно свидетельствует в пользу возможной гипертрофии МВ.

Таблица 1

Средние значения ($\bar{X} \pm m$) некоторых параметров М-ответа передней большеберцовой мышцы крыс контрольной группы и животных, получавших α -липоевую кислоту (α -ЛК) на протяжении от 10 до 60 дней

Группа животных	Параметры М-ответа					
	Латентный период, мс		Амплитуда, мВ		Длительность, мс	
	исходный	после УР	исходная	после УР	исходная	после УР
К	1,2 $\pm$ 0,05	1,3 $\pm$ 0,06	2,6 $\pm$ 0,22	1,7 $\pm$ 0,25 (-36 $\pm$ 8,4 $\bullet$)	5,5 $\pm$ 0,51	7,6 $\pm$ 0,62 (+38 $\pm$ 3,9 $\bullet$)
10 α -ЛК	1,3 $\pm$ 0,05	1,5 $\pm$ 0,11	6,2 $\pm$ 0,68 [+135*]	3,5 $\pm$ 0,48 (-44 $\pm$ 8,6 $\bullet$) [+108*]	7,2 $\pm$ 0,77	13,3 $\pm$ 1,96 (+86 $\pm$ 10,4 $\bullet$) [+76*]
30 α -ЛК	1,3 $\pm$ 0,04	1,6 $\pm$ 0,14	6,7 $\pm$ 0,82 [+157*]	3,5 $\pm$ 0,53 (-49 $\pm$ 6,2 $\bullet$) [+108*]	6,9 $\pm$ 0,74	11,6 $\pm$ 0,92 (+69 $\pm$ 10,5 $\bullet$) [+53*]
60 α -ЛК	1,3 $\pm$ 0,05	1,6 $\pm$ 0,16	6,0 $\pm$ 0,76 [+130*]	3,1 $\pm$ 0,49 (-48 $\pm$ 6,0 $\bullet$) [+88*]	6,6 $\pm$ 0,52	11,1 $\pm$ 0,91 (+67 $\pm$ 10,4 $\bullet$) [+46*]

Примечание: $\bullet$ – в круглых скобках указана статистически значимая разница показателя относительно исходного значения соответствующей группы (в %, $p < 0,05$); * – в квадратных скобках указана статистически значимая разница показателя относительно соответствующего значения контрольной группы (в %, $p < 0,05$).

Способность α -ЛК усиливать биосинтез миогенных белков была обнаружена в исследованиях ряда авторов. Так, установлена способность α -ЛК (в дозе 50 мг/кг) повышать синтез белка в МВ икроножной мышцы животных, и этот эффект, по мнению авторов, реализуется через активацию посредством TLR2 сигнального пути PI3K/Akt [37]. На миотрубках C2C12 обнаружена способность α -ЛК стимулировать синтез белка в МВ несколько другим путем: через усиление экспрессии PPAR β и инактивацию сигнального пути JNK [50].

Вместе с тем, в исследованиях на культивируемых клетках C2C12 миобластомы старых мышей, которым в течение 1 месяца добавляли α -ЛК к питьевой воде (0,75 %), показано, что α -ЛК ослабляет фосфорилирование и соответственно активность mTOR и p70S6k, что приводит к ослаблению белкового синтеза в МВ [36].

В литературе существуют и сведения относительно того, что α -ЛК существенно не влияет на протеосинтез в МВ. Так, в исследованиях на крысах линии Цукер с ожирением и инсулинорезистентностью показано, что α -ЛК, добавляемая к инкубируемым МВ *in vitro* (в концентрации 2 мМ), как и предварительное ее введение в животный организм (50 мг/кг/сутки, на протяжении 10 дней), не отразились на скорости синтеза и деградации белков в МВ эпитрохлеарной мышцы, в отличие от эффекта инсулина, который стимулировал белковый синтез в МВ [51]. Вместе с тем, известна способность α -ЛК повышать

чувствительность и эффективность действия инсулина на СМ [15], что может косвенно стимулировать белковый синтез в МВ и вызывать их некоторую гипертрофию.

Таблица 2

Средние значения ($\bar{X} \pm m$) массы передней большеберцовой мышцы и количества активируемых двигательных единиц (ДЕ) у контрольных животных и крыс, получавших α -липоевую кислоту (α -ЛК) на протяжении от 10 до 60 дней

Группа животных	Масса мышцы, мг	Количество активируемых двигательных единиц	
		исходное (до УР)	после УР
К	399,8 $\pm$ 6,81	14,1 $\pm$ 1,21	10,4 $\pm$ 0,91, (-26 $\pm$ 2,0●)
10 α -ЛК	394,0 $\pm$ 10,96	18,5 $\pm$ 1,68	15,5 $\pm$ 1,62, [+49*]
30 α -ЛК	440,5 $\pm$ 14,17, [+10*]	25,1 $\pm$ 2,93, [+78*]	21,9 $\pm$ 3,14, [+110*]
60 α -ЛК	470,4 $\pm$ 15,52, [+18*]	29,5 $\pm$ 3,56, [+109*]	26,4 $\pm$ 3,76, [+154*]

Примечание: * – в квадратных скобках указана статистически значимая разница показателя относительно контрольной группы (в %, $p < 0,05$); ● – в круглых скобках указана статистически значимая разница показателя относительно исходного значения соответствующей группы (в %, $p < 0,05$).

Таким образом, в основе наблюдаемого нами спустя 30–60 дней введения α -ЛК увеличения амплитуды М-ответов мышцы без значимого изменения их длительности, возрастания массы мышцы и количества активируемых ее ДЕ может отчасти лежать возможная гипертрофия МВ. Повышение же амплитуды М-ответов у крыс 10 α -ЛК-группы, вероятнее всего, обусловлено возможным увеличением амплитуды потенциалов действия МВ или степени синхронизации возбуждения в мышце, поскольку оно не сочеталось с увеличением мышечной массы и количества активируемых ДЕ.

α -ЛК определенным образом повлияла на характер изменения параметров М-ответа мышцы после выполнения УР. Так, исходно повышенная относительно контроля амплитуда М-ответа у животных всех α -ЛК-групп уменьшалась после УР относительно исходного уровня примерно в такой же степени (на 44–49 % у животных 10 α -ЛК - 60 α -ЛК-групп), как и у контроля (на 36 %), но оставалась значимо выше соответствующего контрольного значения ($p < 0,05$, см. табл. 1). Вместе с тем, длительность М-ответов мышцы у крыс α -ЛК-групп после УР возрастала относительно исходных значений в гораздо большей степени (на 86–67 % у животных 10 α -ЛК - 60 α -ЛК-групп), чем у контроля (на 38 %, $p < 0,05$, см. табл. 1). Кроме того, у крыс α -ЛК-групп не наблюдалось значимого относительно исходного уровня уменьшения количества активируемых ДЕ мышцы после УР, типичного для контрольных особей (см. табл. 2). Отсутствие значимого уменьшения количества активируемых ДЕ мышцы на фоне более существенного удлинения М-ответов после УР у животных α -ЛК-групп косвенно свидетельствует о

выключении меньшего количества МВ из возбуждения после утомления, а, значит, о более высокой устойчивости мышцы к утомлению и, возможно, большей скорости восстановления мышцы после утомления.

В пользу позитивного влияния α -ЛК на устойчивость СМ к утомлению указывают и другие авторы. Так, установлено участие α -ЛК в метаболизме пирувата, обуславливающее ее способность предотвращать метаболический ацидоз, и, как следствие, развитие утомления [52], а в исследованиях на высококвалифицированных спортсменах показано, что 21-дневный пероральный прием α -ЛК (в дозе 600 мг/сутки) сопровождался увеличением уровня физической работоспособности [53].

В ряде работ обнаружена способность α -ЛК усиливать антиоксидантную защиту, увеличивать окислительную способность СМ, уменьшая вызванный физическими упражнениями окислительный стресс в них и защищая МВ от повреждений, индуцированных активными формами кислорода, после физических нагрузок. Так, в исследованиях на крысах, которым в пищевой рацион добавляли антиоксидантные компоненты, в том числе α -ЛК (в дозе 50 мг/кг), установлено, что животные, получавшие антиоксиданты, характеризовались более высокой в сравнении с интактными крысами, устойчивостью к физической нагрузке, при этом у них наблюдалась меньшая степень активации аланинтрансаминазы, лактатдегидрогеназы и креатинкиназы, менее выраженное снижение уровня глутатион-S-трансферазы и общей антиоксидантной активности плазмы, а также меньшая степень повышения содержания активных форм кислорода после выполнения истощающих физических упражнений [35]. Кроме того, антиоксидантные добавки увеличивали экспрессию белков митохондриальных комплексов I, II и III, концентрацию мтДНК и факторов транскрипции, участвующих в митохондриальном биогенезе в СМ. Эти данные свидетельствуют о том, что антиоксидантные добавки могут уменьшить окислительное повреждение в митохондриях, вызванное физической нагрузкой, что обуславливает повышение физической работоспособности и ускорение восстановления после утомления.

В пользу способности α -ЛК, даже при кратковременном ее введении, улучшать устойчивость СМ к физическим нагрузкам благодаря антиоксидантному действию указывают и другие авторы. Так, в исследованиях на лошадях, которые на протяжении 5 недель получали α -ЛК (в дозе 25 мг/кг/сутки), установлено ослабление образования свободных радикалов в средней ягодичной мышце и степени увеличения их концентрации в крови после физической нагрузки в сравнении с животными, не получавшими α -ЛК [54]. Кроме того, α -ЛК повышала концентрацию общего глутатиона в мышцах лошадей как в покое, так и при восстановлении. Аналогичные данные получены на цыплятах-бройлерах, получавших в качестве пищевой добавки α -ЛК (в дозе 300 мг/кг) и характеризовавшихся снижением концентрации малонового диальдегида (МДА) – показателя перекисного окисления липидов – в сыворотке, печени и мышцах ног у птиц, а также значительным увеличением содержания глутатиона в печени и α -токоферола в мышцах ног [55]. В исследованиях на крысах, получавших в течение 5 дней α -ЛК (в дозе 100 мг/кг/сутки, перорально) и выполнявших аэробные

упражнения (бег на беговой дорожке в течение 30 минут в день), показано понижение в сравнении с интактными животными концентрации МДА в подошвенной и икроножной мышцах и повышение концентрации токоферола, активности супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы [56]. Причем наиболее выражены эти изменения были в икроножной мышце, особенно чувствительной к окислительному стрессу. Эти данные указывают в пользу способности α -ЛК в сочетании с аэробными упражнениями ослаблять перекисное окисление липидов в СМ.

В то же время в литературе имеются и сообщения, согласно которым прием добровольцами α -ЛК (в дозе 600 мг/сутки, на протяжении 8 дней) не устранял различий в антиоксидантной системе глутатиона между нетренированными и тренированными мужчинами, но модулировал про-антиоксидантный ответ мышцы на повреждающие упражнения, защищая МВ от повреждений путем ослабления окислительного стресса [34]. В исследованиях на здоровых добровольцах установлено, что потребление высоких доз α -ЛК (1200 мг/сутки, в течение 10 дней до тренировки) приводило к двукратному повышению концентрации H_2O_2 и прооксидантных веществ в сыворотке крови перед тренировкой, но при этом предотвращало повышение концентрации NO и продуктов перекисного окисления липидов через 20 мин, 24 часа и 48 часов после тренировки [57]. Кроме того, применение α -ЛК обуславливало существенное повышение уровня эритропоэтина в крови через 24 и 48 часов после тренировки, но при этом уменьшение активности креатинкиназы – основного маркера повреждения МВ. В аналогичных исследованиях других авторов [58] также показано, что прием α -ЛК (в дозе 1200 мг/сутки, в течение 10 дней до тренировки) приводил к существенному повышению уровня H_2O_2 в крови, но предотвращал увеличение концентрации NO после тренировки, при этом наблюдалась тенденция к снижению активности креатинкиназы, увеличение редокс-статуса тиола, а также концентрации IL-6 и IL-10 через 20 минут после тренировки и снижение уровня IL-1 β и ФНО- α до и после тренировки, что предопределило усиление регенерации поврежденных мышц вследствие изменения воспалительного ответа.

Установлены и другие механизмы повышения устойчивости СМ к утомлению под действием α -ЛК. Так, в исследованиях на лошадях, которые на протяжении 5 недель получали α -ЛК (в дозе 25 мг/кг/сутки), показано усиление синтеза белков теплового шока HSP90 и HSP70 в МВ и обусловленное этим повышение их устойчивости к аэробным физическим нагрузкам [59]. Кроме того, у животных, получавших α -ЛК, наблюдалось повышение активности цитрат-синтазы в СМ в покое и меньшая, чем у интактных животных, степень повышения уровня лактата в крови во время физической нагрузки и концентрации аспартатаминотрансферазы и креатинкиназы в плазме крови во время восстановления.

Вместе с тем, в литературе встречаются и сообщения [48], согласно которым прием антиоксидантного коктейля, включающего α -ЛК, обусловил снижение содержания свободных радикалов в крови больных хронической обструктивной болезнью легких только у людей с исходно высоким их содержанием, но это снижение содержания свободных радикалов существенно не влияло на

выносливость и утомляемость четырехглавой мышцы бедра. В других исследованиях на молодых и пожилых добровольцах [49] установлено, что α -ЛК, вводимая в комплексе с витаминами С и Е, обуславливала улучшение перфузии голени и окислительной способности СМ во время упражнений только у пожилых людей и не оказывала существенного влияния на гемодинамику у молодых, что указывает в пользу позитивного влияния α -ЛК только при нарушении окислительного потенциала.

Таким образом, литературные данные относительно эффективности α -ЛК в повышении устойчивости мышц к утомлению неоднозначны. В наших исследованиях получены факты, косвенно указывающие в пользу более высокой устойчивости к утомлению передней большеберцовой мышцы и большей скорости ее восстановления после утомления у животных α -ЛК-групп.

Следовательно, применение α -ЛК обуславливало увеличение амплитуды М-ответов мышцы на фоне неизменной их длительности. Кроме того, спустя 30–60 дней введения α -ЛК наблюдалось увеличение относительно контроля массы мышцы и количества активируемых ее ДЕ, что на фоне возросшей амплитуды М-ответов косвенно свидетельствует в пользу возможной гипертрофии МВ. Наконец, для животных α -ЛК-групп была характерна более высокая, в сравнении с контролем, устойчивость мышцы к утомлению и большая скорость ее восстановления после УР. В пользу этого свидетельствует отсутствие, типичного для контроля, значимого уменьшения количества активируемых ДЕ мышцы после УР. В то же время в связи с участием у животных α -ЛК-групп в вызванном возбуждении мышцы после УР большего, в сравнении с контролем, количества МВ, длительность М-ответов у них после УР возрастала в большей степени, чем у контроля.

Влияние α -липоевой кислоты на сократительную функцию мышцы. Длительное введение α -ЛК определенным образом отразилось как на параметрах исходных одиночных сокращений передней большеберцовой мышцы, так и на характере их изменения после выполнения УР.

Так, спустя первые 10 дней введения α -ЛК амплитуда исходных одиночных сокращений мышцы, их латентный период, скорость сокращения и расслабления значимо не отличались от соответствующих контрольных значений, тогда как скорость расслабления несколько возрастала (на 23 %, $p < 0,05$ относительно контроля, см. табл. 3). Некоторое увеличение скорости расслабления у животных 10 α -ЛК-группы, вероятнее всего, связано с улучшением энергообмена в МВ.

Несмотря на отсутствие существенных изменений параметров исходных одиночных сокращений мышцы животных 10 α -ЛК-группы, для них не было характерно типичное для К-животных, значимое относительно исходного уровня уменьшение амплитуды одиночных сокращений мышцы после УР (см. табл. 3). Данный факт на фоне обсуждаемого ранее отсутствия уменьшения количества активируемых ДЕ мышцы после УР у крыс 10 α -ЛК-группы (см. табл. 2) служит еще одним доказательством в пользу более высокой устойчивости их мышцы к утомлению и большей скорости ее восстановления после УР.

Таблица 3

Средние значения ($\bar{X} \pm m$) параметров одиночного сокращения мышцы контрольных животных и крыс, получавших α -липоевую кислоту (α -ЛК) на протяжении от 10 до 60 дней

Параметры одиночного сокращения	Группы животных			
	К	10 α -ЛК	30 α -ЛК	60 α -ЛК
Амплитуда одиночного сокращения, мм				
исходная	3,0 $\pm$ 0,22	2,9 $\pm$ 0,23	3,7 $\pm$ 0,23, [+24*]	3,9 $\pm$ 0,26, [+29*]
после УР	2,3 $\pm$ 0,21 (-24 $\pm$ 2,2●)	3,0 $\pm$ 0,33	4,9 $\pm$ 0,26 (+32 $\pm$ 5,4●), [+114*]	5,2 $\pm$ 0,45 (+34 $\pm$ 6,2●), [+127*]
Латентный период, одиночного сокращения мс				
исходный	11,2 $\pm$ 0,57	12,6 $\pm$ 0,65	10,9 $\pm$ 0,69	11,1 $\pm$ 0,55
после УР	16,0 $\pm$ 0,83 (+43 $\pm$ 7,5●)	17,8 $\pm$ 0,94 (+42 $\pm$ 8,4●)	15,3 $\pm$ 0,70 (+39 $\pm$ 7,1●)	16,2 $\pm$ 1,13 (+46 $\pm$ 8,2●)
Скорость укорочения при одиночном сокращении, мм/мс				
исходная	0,10 $\pm$ 0,005	0,09 $\pm$ 0,007	0,11 $\pm$ 0,006	0,12 $\pm$ 0,007
после УР	0,09 $\pm$ 0,008	0,07 $\pm$ 0,008	0,12 $\pm$ 0,007, [+33*]	0,13 $\pm$ 0,011, [+40*]
Скорость расслабления при одиночном сокращении, мм/мс				
исходная	0,05 $\pm$ 0,004	0,07 $\pm$ 0,004, [+23*]	0,07 $\pm$ 0,003, [+25*]	0,07 $\pm$ 0,006, [+34*]
после УР	0,04 $\pm$ 0,004	0,06 $\pm$ 0,008	0,09 $\pm$ 0,004, [+99*]	0,09 $\pm$ 0,013, [+106*]

Примечание: ● – в круглых скобках указана статистически значимая разница показателя относительно исходного значения соответствующей группы (в %, $p < 0,05$); * – в квадратных скобках указана статистически значимая разница показателя относительно соответствующего значения контрольной группы (в %, $p < 0,05$).

Спустя 30 и 60 дней введения α -ЛК, как уже обсуждалось ранее, наблюдалось значимое относительно контроля увеличение массы мышцы и количества активируемых ее ДЕ ($p < 0,05$, см. табл. 2), косвенно свидетельствующее в пользу возможной гипертрофии МВ. Кроме того, у животных 30 α -ЛК - 60 α -ЛК-групп значимо относительно контроля возрастала амплитуда одиночных сокращений (на 24–29 %, $p < 0,05$, см. табл. 3) и оставалась увеличенной относительно контроля скорость расслабления (на 25–34 %, $p < 0,05$), что было характерно и для крыс 10 α -ЛК-группы (см. табл. 3). Таким образом, длительное введение α -ЛК обусловило улучшение параметров исходных одиночных сокращений мышцы, в основе которого могут лежать как некоторая гипертрофия МВ, так и улучшение энергетического обеспечения и энергообмена в них.

Кроме того, у животных 30 α -ЛК - 60 α -ЛК-групп, подобно 10 α -ЛК-группе, наблюдалась более высокая устойчивость мышцы к утомлению и большая скорость восстановления после утомления. В пользу этого свидетельствуют следующие факты. Во-первых, амплитуда одиночного сокращения мышцы 30 α -ЛК - 60 α -ЛК-групп после УР не только не снижалась относительно исходного уровня, что было характерно для К-животных, а даже значимо увеличивалась (на 32–34 %, $p < 0,05$, см.

табл. 3). Во-вторых, скорость укорочения и расслабления после выполнения УР у крыс 30 α -ЛК - 60 α -ЛК-групп, подобно К-животным, не претерпевала значимых изменений относительно исходных значений, но все же уменьшалась после УР в меньшей степени, чем у контроля ($p < 0,05$), в связи с чем превосходила соответствующие контрольные значения ($p < 0,05$, см. табл. 3). Наконец, как уже обсуждалось ранее, выполнение УР мышцей животных 30 α -ЛК - 60 α -ЛК-групп не приводило к значимому относительно исходного уровня уменьшению количества активируемых ДЕ мышцы, типичному для К-животных (см. табл. 2).

Таким образом, длительное введение α -ЛК обуславливало возможную гипертрофию МВ, некоторое увеличение амплитуды одиночных сокращений, повышение их устойчивости к утомлению и скорости восстановления после выполнения УР. В основе отмеченных изменений может лежать уже обсуждаемая нами ранее способность α -ЛК усиливать синтез белков в МВ, улучшать энергообмен в них, защищать от окислительного стресса и тем самым ускорять процессы восстановления в МВ после их активности.

На заключительном этапе нашей работы мы сочли необходимым выяснить, как изменяются амплитудные, временные параметры тетанического сокращения и работоспособность передней большеберцовой мышцы крыс в динамике введения α -ЛК. Для этого на нервно-мышечный аппарат наносили сверхпороговые электрические раздражения (длительность импульсов 0,5 мс и сила тока 1000 мкА) с частотой 70 имп/с, что заставляло мышцу работать в режиме гладкого тетануса. Сокращаясь, мышца поднимала груз массой 70 г. Работа мышцы продолжалась до почти полного ее расслабления вследствие утомления на фоне продолжающейся электрической стимуляции малоберцового нерва. На основании записанных эргограмм гладкого тетанического сокращения мышцы определяли максимально достижимую амплитуду тетанического сокращения мышцы, время достижения максимальной амплитуды тетанического сокращения и его скорость, а также продолжительность удержания амплитуды тетануса на максимальном и субмаксимальном уровне (до снижения амплитуды сокращения на 50 % относительно максимально достижимой).

Применение α -ЛК позитивно влияло на параметры тетанического сокращения мышцы. Так, во всех α -ЛК-группах наблюдалось значимое относительно контроля укорочение времени достижения максимальной амплитуды тетануса (на 71–82 %, $p < 0,05$ относительно контроля, см. табл. 4), в результате чего на фоне неизменившейся относительно контроля амплитуды тетануса его скорость существенно возрастала (на 204–379 %, $p < 0,05$ относительно контроля, см. табл. 4). Кроме того, спустя 30 дней введения α -ЛК имело место к тому же удлинение периода максимальной работоспособности мышцы (на 50 %, $p < 0,05$ относительно контроля), которое сохранялось и у животных 60 α -ЛК-группы (см. табл. 4). По окончании 2-х месячного периода введения α -ЛК на фоне всех описанных изменений наблюдалось еще и удлинение периода субмаксимальной работоспособности мышцы (на 53 %, $p < 0,05$ относительно контроля, см. табл. 4).

Таблица 4

Средние значения ($\bar{X} \pm m$) силовых и временных параметров тетанического сокращения мышцы контрольных животных и крыс, получавших α -липоевую кислоту (α -ЛК) на протяжении от 10 до 60 дней

Параметры тетанического сокращения	Группы животных			
	К	10 α -ЛК	30 α -ЛК	60 α -ЛК
Амплитуда тетанического сокращения, мм	13,4 $\pm$ 1,17	11,6 $\pm$ 1,12	11,7 $\pm$ 0,56	11,6 $\pm$ 1,10
Время достижения максимальной амплитуды сокращения, с	0,8 $\pm$ 0,13	0,15 $\pm$ 0,02 [-82*]	0,24 $\pm$ 0,08 [-71*]	0,2 $\pm$ 0,03 [-78*]
Скорость тетанического сокращения, мм/с	16,1 $\pm$ 1,18	77,3 $\pm$ 6,89 [+379*]	49,1 $\pm$ 2,92 [+204*]	63,3 $\pm$ 6,98 [+292*]
Длительность удержания максимальной амплитуды тетанического сокращения (период максимальной работоспособности мышцы), с	3,6 $\pm$ 0,39	4,4 $\pm$ 0,59	5,5 $\pm$ 0,68 [+50*]	7,3 $\pm$ 0,93 [+101*]
Длительность снижения амплитуды сокращения на 50 % относительно максимальной (период субмаксимальной работоспособности мышцы), с	9,1 $\pm$ 1,08	11,3 $\pm$ 1,26	8,5 $\pm$ 0,52	14,1 $\pm$ 1,68 [+53*]

Примечание: * – в квадратных скобках указана статистически значимая разница показателя относительно контрольной группы (в %, $p < 0,05$).

Таким образом, применение α -ЛК сопровождалось некоторым улучшением, в сравнении с контролем, скорости тетанического сокращения мышцы, а также удлинением периодов максимальной и субмаксимальной ее работоспособности. В основе отмеченных изменений может лежать способность α -ЛК улучшать энергообеспечение МВ [15, 45] и интенсифицировать энергообмен в них [2, 7], предотвращать развитие ацидоза, обуславливающего утомление мышцы [2], поддерживать нормальный биогенез в митохондриях в условиях энергодефицита [60], способствовать улучшению силы мышечных сокращений вследствие усиления синтеза миогенных белков [37, 50], выступать в роли ростового фактора для мышечной ткани [52], стимулировать образование новых митохондрий в МВ путем стимуляции экспрессии PGC-1 α [16], способствовать улучшению мышечного кровотока, усиливая экспрессию эндотелиальной NO-синтазы [18], обуславливающей вазодилатацию местных сосудов и улучшение органного кровотока [17, 19], уменьшать степень оксидации МВ в момент их активности и, как следствие, повышать их устойчивость к утомлению и повреждениям [32, 55, 56, 58].

Подводя итог результатам наших исследований, необходимо заключить, что длительное применение α -ЛК обусловило увеличение массы передней большеберцовой мышцы, амплитуды одиночного сокращения, скорости тетанического сокращения, удлинение периодов ее максимальной и субмаксимальной работоспособности, а также существенное ускорение восстановления мышцы после выполнения УР.

Полученные нами в модельных экспериментах на животных данные подтверждают позитивное влияние α -ЛК на мышечный аппарат, в том числе на работоспособность скелетной мышцы и ее устойчивость к утомлению, а также скорость восстановления после УР, что позволяет рассматривать α -ЛК как одно из средств для повышения функциональных возможностей скелетной мускулатуры.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Введение α -ЛК в животный организм привело к увеличению амплитуды М-ответов мышцы (на 135–130 % у животных 10 α -ЛК - 60 α -ЛК-групп в сравнении с контролем, $p<0,05$) без значимого изменения их длительности. Кроме того, спустя 30–60 дней введения α -ЛК наблюдалось значимое в сравнении с контролем ($p<0,05$) увеличение количества активируемых двигательных единиц (на 78–109 %) и массы мышцы (на 10–18 %). Эти факты косвенно указывают в пользу возможных улучшения синхронизации возбуждения в мышце, увеличения амплитуды потенциала действия мышечных волокон и их гипертрофии.
2. α -ЛК позитивно отразилась на сократительной функции передней большеберцовой мышцы, о чем свидетельствуют увеличение в сравнении с контролем ($p<0,05$) скорости расслабления при одиночном сокращении (на 23–34 % в 10 α -ЛК - 60 α -ЛК-группах), амплитуды одиночных сокращений (на 24–29 % в 30 α -ЛК - 60 α -ЛК-группах) и скорости тетанического сокращения (на 204–379 % в 10 α -ЛК - 60 α -ЛК-группах).
3. Длительное введение α -ЛК в животный организм обусловило удлинение в сравнении с контролем ($p<0,05$) периода максимальной (на 50–101% у животных 30 α -ЛК - 60 α -ЛК-групп) и субмаксимальной (на 53 % у особей 60 α -ЛК-группы) работоспособности мышцы.
4. α -ЛК предопределила более высокую в сравнении с контролем устойчивость мышцы к утомлению и большую скорость ее восстановления после утомления. В пользу этого указывают отсутствие у животных всех α -ЛК-групп значимого уменьшения амплитуды одиночных сокращений и количества активируемых двигательных единиц мышцы после утомляющей работы, типичное для К-особей, на фоне более существенного в сравнении с контролем ($p<0,05$) удлинения М-ответов, а также меньшая в сравнении с контролем ($p<0,05$) степень снижения скорости укорочения и расслабления одиночных сокращений после утомляющей работы у крыс 30 α -ЛК- и 60 α -ЛК-групп.

Список литературы

1. Воробьева О. В. Альфа-липоевая кислота – спектр клинического применения / О. В. Воробьева // Медицинский алфавит. Больница – все для ЛПУ. – 2012. – № 3. – С. 71–77.
2. Лукьянчук В. Д. Фармакологическая коррекция нарушений энергетического обмена при воспалительно-дистрофическом процессе в парадонте / В. Д. Лукьянчук, О. А. Шпулина // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2006. – Т. 69, № 4. – С. 51–56.

3. Camiolo G. α -Lipoic Acid Reduces Iron-induced Toxicity and Oxidative Stress in a Model of Iron Overload / G. Camiolo, D. Tibullo, C. Giallongo [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – V. 20, No 3. – P. pii: E609.
4. Строков И. А. Новый взгляд на возможности альфа-липоевой кислоты: доказанная клиническая эффективность и перспективы (обзор литературы) / И. А. Строков // *Consilium medicum.* – 2010. – № 2. – С. 89–95
5. Mayr J. A. Lipoic acid synthetase deficiency causes neonatal-onset epilepsy, defective mitochondrial energy metabolism, and glycine elevation / J. A. Mayr, F. A. Zimmermann, C. Fauth [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 2011. – V. 89, No 6. – P. 792–797.
6. Kishita Y. Intra-mitochondrial Methylation Deficiency Due to Mutations in SLC25A26 / Y. Kishita, A. Pajak, N. A. Bolar [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 2015. – V. 97, No 5. – P. 761–768.
7. Pashaj A. α -Lipoic acid as a triglyceridelowering nutraceutical / A. Pashaj, M. Xia, R. Moreau // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 2015. – V. 93, No 12. – P. 1029–1041.
8. Haghighatdoost F. The effect of alpha-lipoic acid on inflammatory mediators: a systematic review and meta-analysis on randomized clinical trials / F. Haghighatdoost, M. Hariri // *Eur. J. Pharmacol.* – 2019. – V. 849, No 15. – P. 115–123.
9. Kim Y. W. Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease / Y. W. Kim, T. V. Byzova // *Blood.* – 2014. – V. 123, No 5. – P. 625–631.
10. Щелконогов В. А. Исследование влияния липосомальной формы α -липоевой кислоты на систему гемостаза человека / Щелконогов В. А., Саврас К. С., Жигалова К. Н. [и др.] // *Медицинский алфавит.* – 2018. – Т.3. Современная лаборатория, № 26. – С. 52–57.
11. Timmers S. Prevention of high-fat diet-induced muscular lipid accumulation in rats by alpha lipoic acid is not mediated by AMPK activation / S. Timmers, J. de Vogel-van den Bosch, M. C. Towler [et al.] // *J. Lipid Res.* – 2010. – V. 51, No 2. – P. 352–359.
12. Yi X. Reversal of obesity-induced hypertriglyceridemia by (R)- α -lipoic acid in ZDF (fa/fa) rats / X. Yi, A. Pashaj, M. Xia [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2013. – V. 439, No 3. – P. 390–395.
13. Park K. G. Alpha-lipoic acid decreases hepatic lipogenesis through adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)-dependent and AMPK-independent pathways / K. G. Park, A. K. Min, E. H. Koh [et al.] // *Hepatology.* – 2008. – V. 48, No 5. – P. 1477–1486.
14. Hahm J. R. Alpha-lipoic acid attenuates adipocyte differentiation and lipid accumulation in 3T3-L1 cells via AMPK-dependent autophagy / J. R. Hahm, H. S. Noh, J. H. Ha [et al.] // *Life Sci.* – 2014. – V. 100, No 2. – P. 125–132.
15. Lee W. J. Alpha-lipoic acid increases insulin sensitivity by activating AMPK in skeletal muscle / W. J. Lee, K. H. Song, E. H. Koh [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2005. – V. 332, No 3. – P. 885–891.
16. Kanabus M. Development of pharmacological strategies for mitochondrial disorders / M. Kanabus, S. J. Heales, S. Rahman // *British Journal of Pharmacology.* – 2014. – Vol. 171, No 8. – P. 1798–1817.
17. Emmez H. Anti-apoptotic and neuroprotective effects of alpha-lipoic acid on spinal cord ischemia-reperfusion injury in rabbits / H. Emmez, Z. Yildirim, A. Kale // *Acta Neurochir.* – 2010. – Vol. 152, No 9. – P. 1591–1601.
18. Hurdag C. The effects of alpha-lipoic acid on nitric oxide synthetase dispersion in penile function in streptozotocin-induced diabetic rats / C. Hurdag, H. Ozkara, S. Citci // *Int. J. Tissue React.* – 2005. – V. 27, No 3. – P. 145–150.
19. Toklu H. Z. Neuroprotective Effects of Alpha-Lipoic Acid in Experimental Spinal Cord Injury in Rats / H. Z. Toklu, T. Hakan, H. Celik // *J. Spinal. Cord. Med.* – 2010. – V. 33, No 4. – P. 401–409.
20. Полещук А. В. Влияние альфа-липоевой кислоты на состояние микроциркуляторного русла головного мозга при экспериментальной черепно-мозговой травме у лабораторных животных / А. В. Полещук, К. А. Дроздов, Н. А. Андреева [и др.] // *Тихоокеанский медицинский журнал.* – 2012. – № 4. – С. 25–28.
21. Rocamonde B. Lipoic Acid Treatment after Brain Injury: Study of the Glial Reaction / B. Rocamonde, S. Paradells, C. Barcia // *Clin. and Develop. Immunol.* – 2013. – Article ID 521939.
22. Чуканова Е. И. Влияние тиоктацида на клинические проявления и течение дисциркуляторной энцефалопатии / Е. И. Чуканова // *Рус. мед. журн.* – 2010. – Т. 18, № 16. – С. 1027–1030.

23. Shinto L. A Randomized Placebo-Controlled Pilot Trial of Omega-3 Fatty Acids and Alpha Lipoic Acid in Alzheimer's Disease / L. Shinto, J. Quinn, T. Montine // *J. Alzheimer's Dis.* – 2014. – V. 38, No 1. – P. 111–120.
24. Phillipson T. Management of the aging risk factor for Parkinson's disease / T. Phillipson // *Neurobiology of Aging.* – 2014. – V. 35, No 4. – P. 847–857.
25. Mangelsdorf I. Healing of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Case Report / I. Mangelsdorf, H. Walach, J. Mutter // *Complement Med. Res.* – 2017. – V. 24, No 3. – P. 175–181.
26. Sun L.-Q. The protective effect of alpha lipoic acid on Schwann cells exposed to constant or intermittent high glucose / L.-Q. Sun, Y.-Y. Chen, X.-J. Wang // *Biochem. Pharmacol.* – 2012. – V. 84, No 7. – P. 961–973.
27. Heitzer T. Beneficial effects of alpha-lipoic acid and ascorbic acid on endothelium-dependent, nitric oxide-mediated vasodilation in diabetic patients: relation to parameters of oxidative stress / T. Heitzer, B. Finckh, S. Albers // *Free Radic. Biol. Med.* – 2001. – V. 31, No 1. – P. 53–61.
28. Vishwanath S. Metabolic myopathy presenting with polyarteritis nodosa: a case report / S. Vishwanath, M. Abdullah, A. Elbalkhi [et al.] // *J. Med. Case Rep.* – 2011. – V. 5, No 1. – P. 262.
29. Liu J. Reloading functionally ameliorates disuse-induced muscle atrophy by reversing mitochondrial dysfunction, and similar benefits are gained by administering a combination of mitochondrial nutrients / J. Liu, Y. Peng, Z. Feng [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2014. – V. 69. – P. 116–128.
30. Hong O. K. Alpha-lipoic acid preserves skeletal muscle mass in type 2 diabetic OLETF rats / O. K. Hong, J. W. Son, H. S. Kwon [et al.] // *Nutr. Metab. (Lond).* – 2018. – V. 15, No 1. – P. 66.
31. Aydin A. Effects of alpha lipoic acid on ischemia-reperfusion injury in rat hindlimb ischemia model / A. Aydin, A. M. Yildirim // *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* – 2016. – V. 22, No 6. – P. 509–515.
32. Favero G. A comparison of melatonin and α -lipoic acid in the induction of antioxidant defences in L6 rat skeletal muscle cells / G. Favero, L.F. Rodella, L. Nardo Giugno L. // *Age (Dordr).* – 2015. – V. 37, No 4. – P. 9824–9828.
33. Tamilselvan J. Age-dependent upregulation of p53 and cytochrome c release and susceptibility to apoptosis in skeletal muscle fiber of aged rats: role of carnitine and lipoic acid / J. Tamilselvan, G. Jayaraman, K. Sivarajan [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2007. – V. 43, No 12. – P. 1656–1669.
34. Zembron-Lacny A. Assessment of the antioxidant effectiveness of alpha-lipoic acid in healthy men exposed to muscle-damaging exercise / A. Zembron-Lacny, M. Słowinska-Lisowska, Z. Szygula [et al.] // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2009. – V. 60, No 2. – P. 139–143.
35. Sun M. Mitochondrial nutrients stimulate performance and mitochondrial biogenesis in exhaustively exercised rats / M. Sun, F. Qian, W. Shen [et al.] // *Scand. J. Med. Sci. Sports.* – 2012. – V. 22, No 6. – P. 764–775.
36. Wang Y. Alpha-Lipoic acid increases energy expenditure by enhancing adenosine monophosphate-activated protein kinase-peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 α signaling in the skeletal muscle of aged mice / Y. Wang, X. Li, Y. Guo [et al.] // *Metabolism.* – 2010. – V. 59, No 7. – P. 967–976.
37. Jing Y. α -Lipoic Acids Promote the Protein Synthesis of C2C12 Myotubes by the TLR2/PI3K Signaling Pathway / Y. Jing, X. Cai, Y. Xu [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* – 2016. – V. 64, No 8. – P. 1720–1729.
38. Strobel N.A. Antioxidant supplementation reduces skeletal muscle mitochondrial biogenesis / N. A. Strobel, J. M. Peake, A. Matsumoto [et al.] // *Med. Sci. Sports Exerc.* – 2011. – V. 43, No 6. – P. 1017–1024.
39. Mohammed M. A. Alpha-lipoic acid protects against dexamethasone-induced metabolic abnormalities via APPL1 and PGC-1 α up regulation / M. A. Mohammed, M. O. Mahmoud, A. S. Awaad [et al.] // *Steroids.* – 2019. – V. 144. – P. 1–7.
40. Лалетин В. С. Липоевая кислота как потенциальный прооксидант / В. С. Лалетин, Л. С. Колесниченко // *Сибирский медицинский журнал.* – 2010. – Т. 92, № 1. – С. 72–74.
41. Cakatay U. Postmitotic tissue selenium and manganese levels in alpha-lipoic acid-supplemented aged rats / U. Cakatay, R. Kayali, A.R. Kiziler [et al.] // *Chem. Biol. Interact.* – 2008. – V. 171, No 3. – P. 306–311.
42. Kayali R. Effect of alpha-lipoic acid supplementation on markers of protein oxidation in post-mitotic tissues of ageing rat / R. Kayali, U. Cakatay, T. Akçay [et al.] // *Cell Biochem. Funct.* – 2006. – V. 24, No 1. – P. 79–85.

43. Cakatay U. Pro-oxidant actions of alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid / U. Cakatay // *Med. Hypotheses*. – 2006. – V. 66, No 1. – P. 110–117.
44. Kim J. I. Induction of ER stress-mediated apoptosis by α -lipoic acid in A549 cell lines / J. I. Kim, S. R. Cho, C. M. Lee [et al.] // *Korean J. Thorac. Cardiovasc.* – 2012. – V. 45, No 1. – P. 1–10.
45. Saengsirisuwan V. Effects of exercise training and antioxidant R-ALA on glucose transport in insulin-sensitive rat skeletal muscle / V. Saengsirisuwan, F. R. Perez, T. R. Kinnick [et al.] // *J. Appl. Physiol.* – 2002. – V. 92, No 1. – P. 50–58.
46. Rossman M. J. Oxidative stress and COPD: the effect of oral antioxidants on skeletal muscle fatigue / M. J. Rossman, H. J. Groot, V. Reese [et al.] // *Med. Sci. Sports Exerc.* – 2013. – V. 45, No 7. – P. 1235–1243.
47. Wray D. W. Antioxidants and aging: NMR-based evidence of improved skeletal muscle perfusion and energetics / D. W. Wray, S. K. Nishiyama, A. Monnet [et al.] // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2009. – V. 297, No 5. – P. H1870–H1875.
48. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под ред. А. Н. Миронова, Н. Д. Бунатян. – Москва: Минздрав РФ, ЗАО «Гриф и К», 2012. – 944 с.
49. Galea V. The number and relative size of motor units estimated by computer / V. Galea, H. De Bruin, R. Cavašin [et al.] // *Muscle and Nerve*. – 1991. – V. 14, No 11. – P. 1123–1130.
50. Rousseau A. S. α -Lipoic acid up-regulates expression of peroxisome proliferator-activated receptor β in skeletal muscle: involvement of the JNK signaling pathway / A. S. Rousseau, B. Sibille, J. Murdaca [et al.] // *FASEB J.* – 2016. – V. 30, No 3. – P. 1287–1299.
51. Weinstein R. B. Antioxidant alpha-lipoic acid and protein turnover in insulin-resistant rat muscle / R. B. Weinstein, H. J. Tritschler, E. J. Henriksen // *Free Radic. Biol. Med.* – 2001. – V. 30, No 4. – P. 383–388.
52. Трегубова И. А. Антиоксиданты: современное состояние и перспективы / И. А. Трегубова, В. А. Косолапов, А. А. Спасов // *Успехи физиологических наук*. – 2012. – Т. 43, № 1. – С. 75–94.
53. Яценко А. Г. Влияние альфа-липоевой кислоты на функциональное состояние кардиореспираторной системы и уровень физической работоспособности спортсменов высокого класса / А. Г. Яценко, Е. Н. Лысенко, В. Н. Жовтяк [и др.] // *Физическое воспитание студентов творческих специальностей*. – 2003. – № 6. – С. 95–104.
54. Kinnunen S. Alpha-Lipoic acid modulates thiol antioxidant defenses and attenuates exercise-induced oxidative stress in standardbred trotters / S. Kinnunen, N. Oksala, S. Hyypä [et al.] // *Free Radic. Res.* – 2009. – V. 43, No 8. – P. 697–705.
55. Chen P. Dietary lipoic acid influences antioxidant capability and oxidative status of broilers / P. Chen, Q. G. Ma, C. Ji [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2011. – V. 12, No 12. – P. 8476–8488.
56. Chae C. H. The combination of alpha-lipoic acid supplementation and aerobic exercise inhibits lipid peroxidation in rat skeletal muscles / C. H. Chae, C. H. Shin, H. T. Kim // *Nutr. Res.* – 2008. – V. 28, No 6. – P. 399–405.
57. Morawin B. The combination of α -lipoic acid intake with eccentric exercise modulates erythropoietin release / B. Morawin, D. Turowski, M. Nacz // *Biol. Sport.* – 2014. – V. 31, No 3. – P. 179–185.
58. Zembron-Lacny A. Physical activity and alpha-lipoic acid modulate inflammatory response through changes in thiol redox status / A. Zembron-Lacny, M. Gajewski, M. Nacz // *J. Physiol. Biochem.* – 2013. – V. 69, No 3. – P. 397–404.
59. Kinnunen S. Alpha-Lipoic acid supplementation enhances heat shock protein production and decreases post exercise lactic acid concentrations in exercised standardbred trotters / S. Kinnunen, S. Hyypä, N. Oksala [et al.] // *Res. Vet. Sci.* – 2009. – V. 87, No 3. – P. 462–467.
60. Романцова Т. И. Потенциальные возможности применения альфа-липоевой кислоты (Берлитион®300) в лечении метаболического синдрома / Т. И. Романцова, И. С. Кузнецов // *Ожирение и метаболизм*. – 2009. – № 3. – С. 10–14.

EFFECTS OF LONG-TERM ADMINISTRATION OF α -LIPOIC ACID ON THE NEUROMUSCULAR APPARATUS IN ANIMAL EXPERIMENTS

Trush V. V.¹, Sobolev V. I.²

¹Donetsk national university, Donetsk, Ukraine

²V. I. Vernadsky Crimean Federal University, Yalta, Russia

E-mail: ver.trush@yandex.ru

The aim of the research was to study in animals experiments the functional parameters of mixed-type skeletal muscle with a predominance of glycolytic fibers (*m. tibialis anterior*), constituting the majority of the muscle apparatus of mammals, in the dynamics of administration of α -lipoic acid (α -LA) in a moderate pharmacological dose (35 mg/kg) for a period of 10 to 60 days.

Methods. The experiments were performed on sexually mature female rats (190–200 g) divided into 2 groups: the control (n = 10, C-group) and the experimental (n = 30, α -LA-group), the animals of which received α -lipoic acid ("Berlition 600", BERLIN-CHEMIE, Germany) at a dose of 35 mg/kg (daily, subcutaneously) for 10, 30 and 60 days. Thus, the experimental group was subsequently divided into 3 subgroups (n = 10 in each), each of which received a different number of α -LA injections: 10 (10 α -LA-group), 30 (30 α -LA-group) and 60 (60 α -LA-group).

Upon completion of the α -LA administration for anesthetized animals (sodium thiopental, 100 mg/kg, intraperitoneally), an acute experiment the electrophysiological and contractile parameters of the anterior tibial muscle were studied using stimulation electromyography and myography. The excitement and contraction of a muscle was induced by suprathreshold electrical current via the fibular nerve stimulation.

Results. The administration of α -LA led to an increase in the amplitude of M-responses of muscle (by 135–130% in animals of 10 α -LA - 60 α -LA-groups compared to control, $p < 0,05$) without significant change in their duration. In addition, after 30–60 days of α -LA injection, there was a significant increase in the number of activated muscle motor units (by 78–109 %) and muscle mass (by 10–18 %) compared with the control ($p < 0,05$). These facts indirectly testify in favor of possible improvements in the synchronization of excitement in the muscle, an increase in the amplitude of the action potential of muscle fibers and their hypertrophy.

α -LA had a positive effect on the contractile function of the anterior tibial muscle. This is indicated by increase in comparison with control ($p < 0,05$) of the speed of relaxation of a single contraction (by 23–34 % in 10 α -LA - 60 α -LA-groups), the amplitude of single contractions (by 24–29 % in 30 α -LA - 60 α -LA-groups) and the speed of tetanic contraction (by 204–379 % in 10 α -LA - 60 α -LA-groups). Long-term administration of α -LA caused elongation in comparison with the control ($p < 0,05$) of the maximum (by 50–101 % in animals of 30 α -LA - 60 α -LA-groups) and submaximal (by 53 % in specimens 60 α -LA-group) period of muscle capacity.

α -LA predetermined the higher in comparison with the control muscle resistance to fatigue and higher speed of its recovery after fatigue. This is evidenced by the absence in

animals of all α -LA-groups of a significant decrease in the amplitude of single contractions and the number of activated muscle motor units after fatigable work (FW), typical for C-individuals, against the background of more significant in comparison with the control ($p < 0,05$) of elongation of M-responses, and less degree of reduction in the speed of shortening and relaxation of single contractions after performing FW compared to control ($p < 0,05$).

Conclusion. The data obtained in model experiments on animals confirm positive impact of α -LA on the muscular apparatus, including on operability of a skeletal muscle and its resistance to fatigue and also a recovery rate after FW. These facts allow to consider α -LA as one of means for increase in functionality of the skeletal muscles.

Keywords: skeletal muscle, antioxidants, α -lipoic acid, rats.

References

1. Vorob'eva O. V. Alpha-lipoic acid – a spectrum of clinical practice, *Medicinskij alfavit. Bol'nica – vse dlya LPU (Medical alphabet. Hospital – all for medical institutions)*, 3, 71 (2012) (in Russian)
2. Luk'yanchuk V. D., Shpulina O. A. Pharmacological correction of homeostatic energy exchange under conditions of inflammatory-dystrophic process in parodontium, *Ekspperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya (Experimental and clinical pharmacology)*, **69** (4), 51 (2006) (in Russian)
3. Camiolo G., Tibullo D., Giallongo C., Romano A., Parrinello N.L., Musumeci G., Di Rosa M., Vicario N., Brundo M.V., Amenta F., Ferrante M., Copat C., Avola R., Li Volti G., Salvaggio A., Di Raimondo F., Palumbo G.A., α -Lipoic Acid Reduces Iron-induced Toxicity and Oxidative Stress in a Model of Iron Overload, *Int. J. Mol. Sci.*, **20** (3), E609 (2019) DOI: 10.3390/ijms20030609
4. Stokov I. A. A new look at the possibilities of alpha-lipoic acid: proven clinical efficacy and prospects (literature review), *Consilium medicum*, 2, 89 (2010) (in Russian)
5. Mayr J. A., Zimmermann F. A., Fauth C., Bergheim C., Meierhofer D., Radmayr D., Zschocke J., Koch J., Sperl W., Lipoic acid synthetase deficiency causes neonatal-onset epilepsy, defective mitochondrial energy metabolism, and glycine elevation, *Am. J. Hum. Genet.*, **89** (6), 792 (2011). DOI: 10.1016/j.ajhg.2011.11.011
6. Kishita Y., Pajak A., Bolar N.A., Marobbio C.M., Maffezzini C., Miniero D.V., Monné M., Kohda M., Stranneheim H., Murayama K., Naess K., Lesko N., Bruhn H., Mourier A., Wibom R., Nennesmo I., Jespers A., Govaert P., Ohtake A., Van Laer L., Loeys B.L., Freyer C., Palmieri F., Wredenberg A., Okazaki Y., Wedell A., Intra-mitochondrial Methylation Deficiency Due to Mutations in SLC25A26, *Am. J. Hum. Genet.*, **97** (5), 761 (2015). DOI: 10.1016/j.ajhg.2015.09.013
7. Pashaj A., Xia M., Moreau R., α -Lipoic acid as a triglyceridelowering nutraceutical, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **93** (12), 1029 (2015). DOI: <http://dx.doi.org/10.1139/cjpp-2014-0480>
8. Haghighatdoost F., Hariri M., The effect of alpha-lipoic acid on inflammatory mediators: a systematic review and meta-analysis on randomized clinical trials, *Eur. J. Pharmacol.*, **849** (15), 115 (2019). DOI: 10.1016/j.ejphar.2019.01.065
9. Kim Y. W., Byzova T. V., Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease, *Blood*, **123** (5), 625 (2014). DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2013-09-512749>
10. Shchelkonogov V. A., Savras K. S., Zhigalova K. N., Chekanov A. V., Baranova O. A., Kazarinov K. D., Mudrov V. P., Solovyova E. Yu., Fedin A. I. Study of liposomal form of alpha-lipoic acid effect on human hemostatic system, *Medicinskij alfavit (Medical alphabet)*, 3 Modern laboratory (26), 52 (2018) (in Russian)
11. Timmers S., de Vogel-van den Bosch J., Towler M. C., Schaart G., Moonen-Kornips E., Mensink R. P., Hesselink M. K., Hardie D. G., Schrauwen P., Prevention of high-fat diet-induced muscular lipid accumulation in rats by alpha lipoic acid is not mediated by AMPK activation, *J. Lipid Res.*, **51** (2), 352 (2010). DOI: 10.1194/jlr.M000992

12. Yi X., Pashaj A., Xia M., Moreau R., Reversal of obesity-induced hypertriglyceridemia by (R)- α -lipoic acid in ZDF (fa/fa) rats, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **439** (3), 390 (2013). DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.08.063
13. Park K. G., Min A. K., Koh E. H., Kim H. S., Kim M. O., Park H. S., Kim Y. D., Yoon T. S., Jang B. K., Hwang J. S., Kim J. B., Choi H. S., Park J. Y., Lee I. K., Lee K. U., Alpha-lipoic acid decreases hepatic lipogenesis through adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)-dependent and AMPK-independent pathways, *Hepatology*, **48** (5), 1477 (2008). DOI: 10.1002/hep.22496
14. Hahm J. R., Noh H. S., Ha J. H., Roh G. S., Kim D. R., Alpha-lipoic acid attenuates adipocyte differentiation and lipid accumulation in 3T3-L1 cells via AMPK-dependent autophagy, *Life Sci.*, **100** (2), 125 (2014). DOI: 10.1016/j.lfs.2014.02.001
15. Lee W.J., Song K.H., Koh E.H., Won J.C., Kim H.S., Park H.S., Kim M.S., Kim S.W., Lee K.U., Park J. Y., Alpha-lipoic acid increases insulin sensitivity by activating AMPK in skeletal muscle, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 332 (3), 885 (2005). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.05.035>
16. Kanabus M., Heales S. J., Rahman S., Development of pharmacological strategies for mitochondrial disorders, *British J. of Pharmacol.*, **171** (8), 1798 (2014). DOI: <https://doi.org/10.1111/bph.12456>
17. Emmez H., Yildirim Z., Kale A., Anti-apoptotic and neuroprotective effects of alpha-lipoic acid on spinal cord ischemia-reperfusion injury in rabbits, *Acta Neurochir.*, **152** (9), 1591 (2010). DOI: <https://doi.org/10.1007/s00701-010-0703-9>
18. Hurdag C., Ozkara H., Citci S., The effects of alpha-lipoic acid on nitric oxide synthetase dispersion in penile function in streptozotocin-induced diabetic rats, *Int. J. Tissue React.*, **27** (3), 145 (2005).
19. Toklu H. Z., Hakan T., Celik H., Neuroprotective Effects of Alpha-Lipoic Acid in Experimental Spinal Cord Injury in Rats, *J. Spinal. Cord. Med.*, 33 (4), 401 (2010). DOI: <https://doi.org/10.1080/10790268.2010.11689719>
20. Poleschuk A. V., Drozdov K. A., Andreeva N. A., Balashova T. V., Popova V. V. Effects of Alpha lipoic acid on the state of cerebral microcirculatory bloodstream in case of experimental craniocerebral trauma in laboratory animals, *Tihookeanskij medicinskij zhurnal (Pacific Medical Journal)*, 4, 25 (2012) (in Russian)
21. Rocamonde B., Paradells S., Barcia C., Lipoic Acid Treatment after Brain Injury: Study of the Glial Reaction, *Clin. and Develop. Immunol.*, Article ID 521939 (2013). DOI: <https://doi.org/10.1155/2013/521939>
22. Chukanova E. I. The effect of thioctacid on the clinical manifestations and course of dyscirculatory encephalopathy, *RMJ*, **18** (16), 1027 (2010) (in Russian)
23. Shinto L., Quinn J., Montine T., A Randomized Placebo-Controlled Pilot Trial of Omega-3 Fatty Acids and Alpha Lipoic Acid in Alzheimer's Disease, *J. Alzheimer's Dis.*, **38** (1), 111 (2014). DOI: <https://doi.org/10.3233/jad-130722>
24. Phillipson T., Management of the aging risk factor for Parkinson's disease, *Neurobiology of Aging*, **35** (4), 847 (2014). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.10.073>
25. Mangelsdorf I., Walach H., Mutter J., Healing of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Case Report, *Complement Med. Res.*, **24** (3), 175 (2017). DOI: 10.1159/000477397
26. Sun L.-Q., Chen Y.-Y., Wang X.-J., The protective effect of alpha lipoic acid on Schwann cells exposed to constant or intermittent high glucose, *Biochem. Pharmacol.*, **84** (7), 961 (2012). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.07.005>
27. Heitzer T., Finckh B., Albers S., Beneficial effects of alpha-lipoic acid and ascorbic acid on endothelium-dependent, nitric oxide-mediated vasodilation in diabetic patients: relation to parameters of oxidative stress, *Free Radic. Biol. Med.*, **31** (1), 53 (2001). DOI: [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(01\)00551-2](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(01)00551-2)
28. Vishwanath S., Abdullah M., Elbalkhi A., Ambrus J. L. Jr., Metabolic myopathy presenting with polyarteritis nodosa: a case report, *J. Med. Case Rep.*, **5** (1), 262 (2011). DOI: 10.1186/1752-1947-5-262
29. Liu J., Peng Y., Feng Z., Shi W., Qu L., Li Y., Liu J., Long J., Reloading functionally ameliorates disuse-induced muscle atrophy by reversing mitochondrial dysfunction, and similar benefits are gained by administering a combination of mitochondrial nutrients, *Free Radic. Biol. Med.*, **69**, 116 (2014). DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.01.003

30. Hong O. K., Son J. W., Kwon H. S., Lee S. S., Kim S. R., Yoo S. J., Alpha-lipoic acid preserves skeletal muscle mass in type 2 diabetic OLETF rats, *Nutr. Metab. (Lond.)*, **15** (1), 66 (2018). DOI: 10.1186/s12986-018-0302-y
31. Aydin A., Yildirim A. M., Effects of alpha lipoic acid on ischemia-reperfusion injury in rat hindlimb ischemia model, *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.*, **22** (6), 509 (2016). DOI: 10.5505/tjtes.2016.00258
32. Favero G., Rodella L. F., Nardo L., Giugno L., Cocchi M. A., Borsani E., Reiter R.J., Rezzani R., A comparison of melatonin and α -lipoic acid in the induction of antioxidant defences in L6 rat skeletal muscle cells, *Age (Dordr.)*, **37** (4), 9824 (2015). DOI: 10.1007/s11357-015-9824-7
33. Tamilselvan J., Jayaraman G., Sivarajan K., Panneerselvam C., Age-dependent upregulation of p53 and cytochrome c release and susceptibility to apoptosis in skeletal muscle fiber of aged rats: role of carnitine and lipoic acid, *Free Radic. Biol. Med.*, **43** (12), 1656 (2007). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.08.028>
34. Zembron-Lacny A., Slowinska-Lisowska M., Szygula Z., Witkowski K., Stefaniak T., Dziubek W., Assessment of the antioxidant effectiveness of alpha-lipoic acid in healthy men exposed to muscle-damaging exercise, *J. Physiol. Pharmacol.*, **60** (2), 139 (2009).
35. Sun M., Qian F., Shen W., Tian C., Hao J., Sun L., Liu J., Mitochondrial nutrients stimulate performance and mitochondrial biogenesis in exhaustively exercised rats, *Scand. J. Med. Sci. Sports*, **22** (6), 764 (2012). DOI: 10.1111/j.1600-0838.2011.01314.x
36. Wang Y., Li X., Guo Y., Chan L., Guan X., alpha-Lipoic acid increases energy expenditure by enhancing adenosine monophosphate-activated protein kinase-peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 α signaling in the skeletal muscle of aged mice, *Metabolism*, **59** (7), 967 (2010) DOI: 10.1016/j.metabol.2009.10.018
37. Jing Y., Cai X., Xu Y., Zhu C., Wang L., Wang S., Zhu X., Gao P., Zhang Y., Jiang Q., Shu G., α -Lipoic Acids Promote the Protein Synthesis of C2C12 Myotubes by the TLR2/PI3K Signaling Pathway, *J. Agric. Food Chem.*, **64** (8), 1720 (2016). DOI: 10.1021/acs.jafc.5b05952
38. Strobel N. A., Peake J. M., Matsumoto A., Marsh S. A., Coombes J. S., Wadley G. D., Antioxidant supplementation reduces skeletal muscle mitochondrial biogenesis, *Med. Sci. Sports Exerc.*, **43** (6), 1017 (2011). DOI: 10.1249/MSS.0b013e318203afa3
39. Mohammed M. A., Mahmoud M. O., Awaad A. S., Gamal G. M., Abdelfatah D., Alpha lipoic acid protects against dexamethasone-induced metabolic abnormalities via APPL1 and PGC-1 α up regulation, *Steroids*, **144**, 1 (2019). DOI: 10.1016/j.steroids.2019.01.004
40. Laletin V. S., Kolesnichenko L. S. Lipoic acid as a potential prooxidant, *Sibirskij medicinskij zhurnal (Siberian Medical Journal)*, **92** (1), 72 (2010) (in Russian)
41. Cakatay U., Kayali R., Kiziler A. R., Aydemir B., Postmitotic tissue selenium and manganese levels in alpha-lipoic acid-supplemented aged rats, *Chem. Biol. Interact.*, **171** (3), 306 (2008). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2007.10.001>
42. Kayali R., Cakatay U., Akçay T., Altuğ T., Effect of alpha-lipoic acid supplementation on markers of protein oxidation in post-mitotic tissues of ageing rat, *Cell Biochem. Funct.*, **24** (1), 79 (2006). DOI: <https://doi.org/10.1002/cbf.1190>
43. Cakatay U., Pro-oxidant actions of alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid, *Med. Hypotheses*, **66** (1), 110 (2006). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2005.07.020>
44. Kim J. I., Cho S. R., Lee C. M., Park E. S., Kim K. N., Kim H. C., Lee H. Y., Induction of ER stress-mediated apoptosis by α -lipoic acid in A549 cell lines, *Korean J. Thorac. Cardiovasc.*, **45** (1), 1 (2012). DOI: <https://doi.org/10.5090/kjtc.2012.45.1.1>
45. Saengsirisuwan V., Perez F. R., Kinnick T. R., Henriksen E. J., Effects of exercise training and antioxidant R-ALA on glucose transport in insulin-sensitive rat skeletal muscle, *J. Appl. Physiol.*, **92** (1), 50 (2002). DOI: <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.000617.2001>
46. Rossman M. J., Groot H.J., Reese V., Zhao J., Amann M., Richardson R.S., Oxidative stress and COPD: the effect of oral antioxidants on skeletal muscle fatigue, *Med. Sci. Sports Exerc.*, **45** (7), 1235 (2013). DOI: 10.1249/MSS.0b013e3182846d7e
47. Wray D. W., Nishiyama S. K., Monnet A., Wary C., Duteil S. S., Carlier P. G., Richardson R. S., Antioxidants and aging: NMR-based evidence of improved skeletal muscle perfusion and energetics, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **297** (5), H1870 (2009). DOI: 10.1152/ajpheart.00709.2009

48. *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv (Guidelines for conducting preclinical studies of drugs)*, A. N. Mironova, N. D. Bunatyan, eds. Moscow: Minzdrav RF, ZAO «Grif i K»; 2012. (In Russian)
49. Galea V., De Bruin H., Cavašin R., McComas A. J., The number and relative size of motor units estimated by computer, *Muscle and Nerve*, **14** (11), 1123 (1991). DOI: <https://doi.org/10.1002/mus.880141114>
50. Rousseau A.S., Sibille B., Murdaca J., Mothe-Satney I., Grimaldi P.A., Neels J.G., α -Lipoic acid up-regulates expression of peroxisome proliferator-activated receptor β in skeletal muscle: involvement of the JNK signaling pathway, *FASEB J.*, **30** (3), 1287 (2016). DOI: 10.1096/fj.15-280453
51. Weinstein R. B., Tritschler H. J., Henriksen E. J., Antioxidant α -lipoic acid and protein turnover in insulin-resistant rat muscle, *Free Radic. Biol. Med.*, **30** (4), 383 (2001). DOI: [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(00\)00489-5](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(00)00489-5)
52. Tregubova I. A., Kosolapova V. A., Spasov A. A., Antioxidants: Current Situation and Perspectives, *Uspekhi fiziologicheskikh nauk (Advances in physiological sciences)*, **43** (1), 75 (2012). (In Russian)
53. Yashchenko A. J., Lysenko O. N., Djowtyak B. N., Maydanyuk E. N., Kais Nairat, The influence of α -lipoid acid on functional state of cardiorespiratory system and physical workability in elite athletes, *Fizicheskoe vospitanie studentov tvorcheskikh special'nostej (Physical education of students of creative specialties)*, 6, 95 (2003). (in Russian)
54. Kinnunen S., Oksala N., Hyypä S., Sen C. K., Radak Z., Laaksonen D. E., Szabó B., Jakus J., Atalay M., α -Lipoic acid modulates thiol antioxidant defenses and attenuates exercise-induced oxidative stress in standardbred trotters, *Free Radic. Res.*, **43** (8), 697 (2009). DOI: 10.1080/10715760903037673
55. Chen P., Ma Q. G., Ji C., Zhang J. Y., Zhao L. H., Zhang Y., Jie Y. Z., Dietary lipoic acid influences antioxidant capability and oxidative status of broilers, *Int. J. Mol. Sci.*, **12** (12), 8476 (2011). DOI: 10.3390/ijms12128476
56. Chae C. H., Shin C. H., Kim H. T., The combination of α -lipoic acid supplementation and aerobic exercise inhibits lipid peroxidation in rat skeletal muscles, *Nutr. Res.*, **28** (6), 399 (2008). DOI: 10.1016/j.nutres.2008.02.010
57. Morawin B., Turowski D., Naczek M., Siatkowski I., Zembron-Lacny A., The combination of α -lipoic acid intake with eccentric exercise modulates erythropoietin release, *Biol. Sport.*, **31** (3), 179 (2014). DOI: 10.5604/20831862.1111435
58. Zembron-Lacny A., Gajewski M., Naczek M., Dziewiecka H., Siatkowski I., Physical activity and α -lipoic acid modulate inflammatory response through changes in thiol redox status, *J. Physiol. Biochem.*, **69** (3), 397 (2013). DOI: 10.1007/s13105-012-0221-8
59. Kinnunen S., Hyypä S., Oksala N., Laaksonen D. E., Hannila M. L., Sen C. K., Atalay M., α -Lipoic acid supplementation enhances heat shock protein production and decreases post exercise lactic acid concentrations in exercised standardbred trotters, *Res. Vet. Sci.*, **87** (3), 462 (2009). DOI: 10.1016/j.rvsc.2009.04.009
60. Romantsova T. I., Kuznetsov I. S., Potential opportunities for treatment of metabolic syndrome with α -lipoic acid (Berlithion®300), *Obesity and metabolism*, 3, 10 (2009). DOI: <https://doi.org/10.14341/2071-8713-5240>. (in Russian)

УДК 612:159.929:591.147:547.262:577.175.8

**МОДИФИКАЦИИ ТРЕВОЖНОГО ПОВЕДЕНИЯ
У АЛКОГОЛИЗИРОВАННЫХ САМЦОВ БЕЛЫХ КРЫС С ДИСБАЛАНСОМ
АНДРОГЕНОВ ПРИ СТИМУЛЯЦИИ ДОФАМИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ
МАДОПАРОМ**

Фролова Г. А., Четверик А. В., Парамонова А. К.

*ГОУ ВПО «Донецкий национальный университет», Донецк, Украина
E-mail: gal_alex_frolova@mail.ru*

В модельных экспериментах на интактных и гонадэктомированных самцах белых крыс исследована возможность коррекции поведенческих нарушений, возникающих на фоне двухнедельной алкоголизации с помощью введения предшественника синтеза дофамина – L-ДОФА (мадопар). Установлено, что L-ДОФА оказал анксиолитический эффект на интактных самцов, не зависимо от их исходного уровня тревожности и позволил скорректировать увеличение тревожности у исходно средне- и низкотревожных животных. У самцов с дефицитом андрогенов L-ДОФА снизил тревожность у высоко- и среднетревожных особей, корректирующего действия на анксиогенный эффект этанола у нетревожных самцов не установлено. Мадопар скорректировал угнетение исследовательской и двигательной активности интактных самцов крыс с исходно крайними уровнями тревожности, вызванное хронической алкоголизацией. Введение предшественника синтеза дофамина не оказало достоверного влияния на показатели исследовательской активности гонадэктомированных алкоголизованных самцов и скомпенсировало сокращение двигательной активности у высокотревожных самцов с дефицитом андрогенов.

Ключевые слова: тревожность, исследовательская активность, двигательная активность, эмоциональность, L-ДОФА, дофамин, этанол.

ВВЕДЕНИЕ

По данным Всемирной организации здравоохранения употребление алкогольсодержащих напитков является одной из основных причин смертности в мире. Причиной настолько серьезных последствий действия этанола для организма является его влияние на функционирование практически всех систем органов [1–4]. Весьма серьезными оказываются и последствия употребления алкоголя для психоэмоциональной сферы животного организма. Данный факт обусловлен характером влияния этилового спирта и его метаболитов на протекание ряда биохимических процессов в головном мозге [5–10]. Известно, что от хода течения этих процессов зависит обмен моноаминов, что в свою очередь, определяет психоэмоциональное состояние индивида. Вместе с тем, общеизвестным является и тот факт, что в основе развития ряда расстройств (тревожных, депрессивных, моторных) лежит изменение работы моноаминергических систем мозга [11, 12].

Исследователями установлена тесная связь между функционированием одной

из ключевых нейрохимических систем головного мозга – дофаминергической – с гонадной системой [13–16]. Однако, не все особенности взаимодействия этих систем установлены и исследованы. Вместе с тем, до конца не выясненным остается вклад индивидуальных особенностей организма к возможным способам коррекции расстройств психоэмоциональной сферы [17–19], индуцированных длительным приемом алкогольсодержащих веществ, что значительно облегчило бы поиск коррекционных мероприятий.

Таким образом, *целью представленной работы* явилась оценка возможного корректирующего влияния предшественника синтеза дофамина (мадопара) на некоторые психоэмоциональные показатели алкоголизированных самцов белых крыс с дисбалансом андрогенов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент выполнен на 80 половозрелых беспородных крысах-самцах массой 160–180г, содержащихся в стандартных условиях вивария (световой режим 12/12, свободный доступ к еде и питью). Все исследования выполнялись в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных» (публикация Национального института здоровья № 85-23, США) и «Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» [20]. Поведенческие исследования производились в первой половине дня. Для оценки показателей поведения, отражающих психоэмоциональное состояние животных, использовались приподнятый крестообразный лабиринт и открытое поле. Исходная группа крыс была разделена случайным образом на 2 равнозначные группы по 40 особей в каждой. Первая (интактные животные) составила группу условного контроля, а вторая подверглась двусторонней гонадэктомии (за 2 недели до исходного тестирования) с целью моделирования состояния дефицита андрогенов. Обе группы крыс подвергались хронической алкоголизации с последующим введением мадопара.

Тревожное поведение подопытных крыс оценивали в приподнятом крестообразном лабиринте (ПКЛ) [21] по суммарному времени пребывания крысы на открытом пространстве лабиринта (открытые рукава и центральная площадка) за 5 минут тестирования, частоте повторных выходов на него и частоте выглядываний из закрытых рукавов. Эмоциональность оценивали по количеству фекальных болюсов. Лабиринт представляет собой площадку, которая приподнята на опорной ножке над уровнем пола на 80 см и состоит из двух рукавов – открытых и закрытых – и центральной платформы в месте их пересечения (10×10 см). Конструкция собрана из пластика, окрашенного в черный цвет. В процессе тестирования животное опускалось на центральную платформу носом в открытый рукав, после чего в течение 5 минут регистрировалось поведение животного.

Для фиксации поведенческой активности использовали продырявленное поле [21] в котором устанавливали исследовательское поведение (по количеству вертикальных стоек и заглядываний в отверстия-норки), двигательную активность (по общему количеству пересеченных квадратов) и груминговую активность (по частоте актов

грумминга) за 5 минут тестирования. Продырявленное поле собрано из пластика, покрашенного в зелено-голубой цвет и имеет линейные размеры 60×60 см. и боковые бортики высотой 40 см. Дно продырявленного поля (ПП) приподнято над уровнем пола на 3 см и разделено на 9 равных квадратов, по периметру которых просверлены отверстия-норки диаметром 3 см. Крыса опускается в центральный квадрат (центр поля) и в течение 5 минут фиксируются указанные выше показатели поведения. После каждого животного используемые установки протирались изнутри мокрыми и сухими салфетками, а также дезодорировались раствором этилового спирта.

После исходного (контрольного) тестирования в описанных выше тестах животные были разделены на три подгруппы в соответствии с проявленным уровнем тревожности в приподнятом крестообразном лабиринте. Необходимость учета индивидуально-типологических особенностей животного организма в подобных исследованиях обусловлены тем, что это позволяет более точно оценивать индивидуальную чувствительность организма к воздействиям различного рода. Базисом таких отличий, по мнению исследователей [22–24], являются индивидуальные особенности течения нейрохимических процессов.

Длительную алкоголизацию моделировали у животных путем внутрибрюшинного введения 10 %-ного раствора этанола из расчета 2 г/кг [25] в течение 14 дней. Стимуляцию дофаминергической системы проводили введением предшественника синтеза дофамина L-ДОФА (мадопар) в дозе 50 мг/кг внутрибрюшинно в течение 14 дней [26]. Таким образом, экспериментальные животные проходили тестирование в батарее описанных тестов трижды: в исходных условиях, после алкоголизации и после введения мадопара. Дисбаланс андрогенов моделировался путем двусторонней гонадэктомии, проведенной под эфирным наркозом по методу Я. Б. Киршенблат [27].

Статистическая обработка

Исходную группу крыс разделяли на подгруппы согласно сигмального отклонения [23]. Обработка первичных данных производилась с использованием пакета программ Statistica 6.0. Поскольку нормальность распределения в тесте Колмогорова-Смирнова не подтвердилась, для работы были использованы непараметрические методы математической статистики (U-критерий Манна-Уитни для независимых переменных). Принятый уровень значимости составлял 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исходное тестирование показало, что уровень тревожности самцов находится в определенной зависимости от гонадного статуса. Поведенческий профиль подопытных животных представлен в таблице 1. Так, группа интактных самцов разделилась на подгруппы с разным уровнем тревожности практически в равных долях, в то время как среди самцов с дисбалансом андрогенов, более половины группы гонадэктомированных крыс показали среднюю тревожность и у 6 самцов выявлено депрессивно-пободное состояние, характеризующееся полным отсутствием какой-либо активности в ПКЛ, результаты изменения поведенческих характеристик которых рассматривались отдельно.

Касательно абсолютных значений поведенческих показателей, следует

отметить следующие факты. Как у интактных, так и гонадэктомированных самцов частота повторных выходов на открытое пространство зависела от исходного уровня их тревожности: чем ниже показатель тревожности, тем чаще самцы совершали повторные выходы на открытое пространство (табл. 1). У низкотревожных самцов с нормальным уровнем андрогенов установлено минимальное количество выглядываний из закрытых рукавов, в то время как численные показатели этого поведенческого акта у высоко- и среднетревожных интактных самцов не отличаются между собой. У крыс с дефицитом андрогенов частота выглядываний не отличалась между животными с разным уровнем тревожности, однако, абсолютные значения показателя у высоко- и среднетревожных ниже (в 1,8–2,2 раза, $p < 0,05$) в сравнении с таковыми у интактных животных. По уровню эмоциональности в ПКЛ не выявлено отличий, определяемых ни уровнем тревожности, ни уровнем андрогенов.

Таблица 1
Поведенческий профиль интактных (ИН) и гонадэктомированных (ГЭ) самцов белых крыс с разным уровнем тревожности в контрольных условиях ($X \pm m$)

Показатели	Группа животных	Уровень тревожности		
		высокий	средний	низкий
Результаты тестирования в приподнятом крестообразном лабиринте				
Время пребывания на открытом пространстве, с	ИН	29,5±5,26 ^{▲*}	82,6±8,13	171,2±15,21 [▲]
	ГЭ	6,0±1,74 ^{▲*}	28,0±2,73 [♦]	61,0±10,11 ^{▲♦}
Количество повторных выходов на открытое пространство	ИН	0,0 ^{▲*}	1,4±0,30	2,1±0,40
	ГЭ	0,0	0,3±0,17 [♦]	1,0±0,00 ^{▲*}
Количество выглядываний из закрытых рукавов	ИН	6,8±1,50 [*]	6,1±1,04	3,5±0,43 [▲]
	ГЭ	3,7±0,89 [♦]	2,8±0,52 [♦]	3,0±1,01
Количество фекальных болюсов	ИН	0,0	0,0	0,0
	ГЭ	0,0	0,0	0,0
Результаты тестирования в продырявленном поле				
Исследовательская активность	ИН	23,3±2,18 ^{▲*}	13,3±1,65	17,7±1,93
	ГЭ	5,0±0,00 ^{▲♦}	2,8±0,68 [♦]	5,3±0,89 ^{▲♦}
Двигательная активность	ИН	23,8±1,93	22,3±1,59	26,8±3,08
	ГЭ	11,0±1,00 [♦]	8,2±1,39 [♦]	10,7±2,68 [♦]
Количество актов груминга	ИН	0,8±0,48	0,4±0,20	1,7±0,33 [▲]
	ГЭ	1,3±0,33	1,4±0,41 [♦]	1,3±0,34

Примечание: ▲ – различия статистически значимы ($p < 0,05$) при сравнении показателей условного контроля (средний уровень тревожности) с группами высокого и низкого уровня тревожности; * – различия статистически значимы ($p < 0,05$) при сравнении показателей группы с крайними уровнями тревожности; ♦ – различия статистически значимы ($p < 0,05$) при сравнении показателей соответствующих подгрупп интактных и гонадэктомированных животных.

Что касается показателей активности (моторной, исследовательской и груминговой) разнотревожных самцов, отличающихся андрогенным статусом, установлено следующее. Прежде всего, обращает на себя тот факт, что численные значения исследовательской и двигательной активности гонадэктомированных крыс ниже таковых интактных внутри выделенных подгрупп (в 3,3–4,8 ($p<0,05$) и 2,2–2,7 ($p<0,05$) раза соответственно). Груминговая активность у самцов с дефицитом андрогенов, напротив, превышает таковую интактных крыс в 1,6 ($p<0,05$) и 3,5 ($p<0,05$) раза среди высоко- и среднетревожных животных. У низкотревожных особей груминговая активность не зависит от андрогенного статуса (см.табл. 1). Вместе с тем, выявлено, исследовательская активность высокотревожных интактных самцов выше таковой у остальных подгрупп тревожности, в то время как среди гонадэктомированных крыс максимальный уровень активности свойственен особям с исходно крайними уровнями тревожности. Двигательная и груминговая активность самцов как с нормальным, так и с пониженным андрогенным статусом, не зависит от уровня их тревожности.

Как было сказано выше, часть гонадэктомированных самцов (6 особей) показали в исходном тестировании депрессивно-подобное состояние, что выражалось в полной неподвижности животного при посадке его в приподнятый крестообразный лабиринт. Изменение поведенческих характеристик этих крыс рассматривалось отдельно. В условиях продырявленного поля такие животные показали крайне низкий уровень исследовательской ($1,0\pm0,00$ поведенческих акта), двигательной ($3,0\pm0,58$ пересеченных квадрата) и отсутствие груминговой активности.

Проведенные исследования о влиянии предшественника синтеза дофамина L-ДОФА на психоэмоциональное состояние алкоголизованных самцов с нормальным и дефицитарным андрогенным состоянием, отличающихся по уровню тревожности, позволили выявить следующие закономерности.

Реакция высокотревожных самцов на длительную алкоголизацию и последующее введение L-ДОФА не зависело от уровня андрогенов: к этанолу такие самцы оказались не чувствительны, а введение предшественника синтеза дофамина привело к увеличению времени пребывания таких животных в 2,1–3,2 раза ($p<0,05$). Как показано на рисунке 1, алкоголизация интактных животных с исходно средним и низким уровнем тревожности оказала анксиогенный эффект, сократив время пребывания крыс этих подгрупп в 2,3 ($p<0,05$) и 1,6 ($p<0,05$) раза соответственно, что в последующем скомпенсировалось L-ДОФА (см. рис. 1 А). Среднетревожные гонадэктомированные самцы на алкоголизацию и L-ДОФА прореагировали так же, как и самцы с высоким уровнем тревожности – к этанолу чувствительности не проявили, в то время как предшественник синтеза дофамина сократил их тревожность в 2,8 ($p<0,05$) раза. Анксиогенный эффект этанола был выявлен у нетревожных гонадэктомированных крыс, что проявлялось в увеличении тревожности в 5,1 ($p<0,05$) раза. Последующее введение L-ДОФА достоверно на время пребывания животных данной подгруппы на открытом пространстве ПКЛ не повлияло (см. рис. 1 Б).

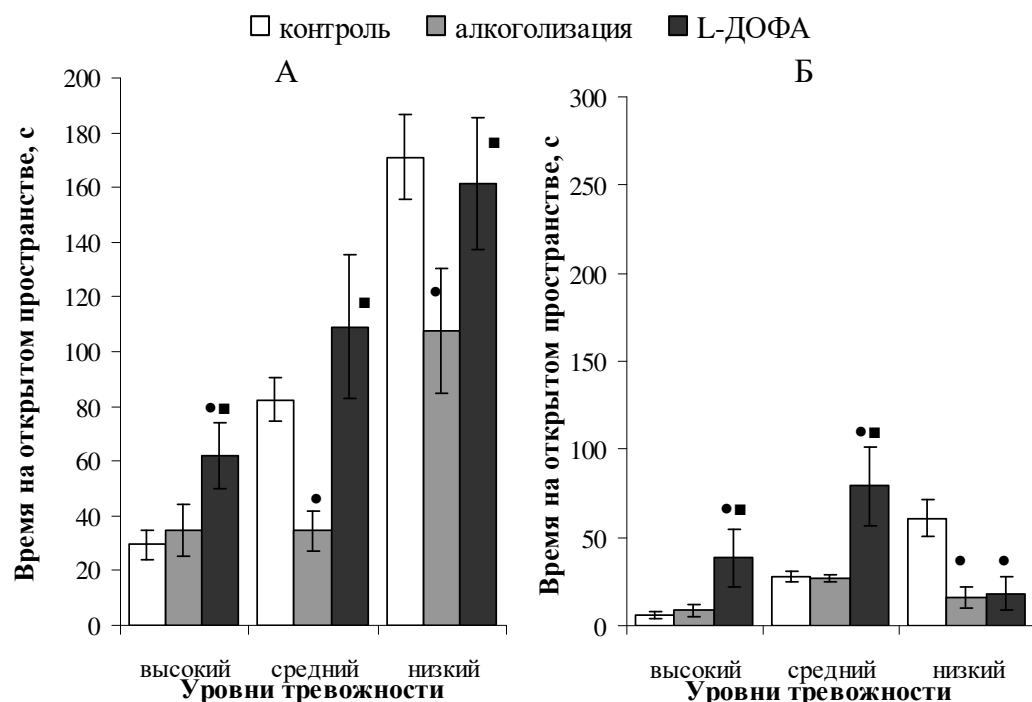


Рис. 1. Характер влияния хронической алкоголизации и последующего введения L-ДОФА на время пребывания на открытом пространстве в приподнятом крестообразном лабиринте интактных (А) и гонадэктомированных (Б) самцов.

Примечание: ● – различия статистически значимы ($p < 0,05$) при сравнении с исходными значениями; ■ – различия статистически значимы ($p < 0,05$) при сравнении показателей алкоголизации и L-ДОФА.

Изменение частоты повторных выходов на открытое пространство лабиринта подтвердило результаты, описанные выше: у интактных и гонадэктомированных самцов, показавших увеличение тревожности на фоне алкоголизации, сократилось (в 2,0–3,3 раза, $p < 0,05$) и количество проявлений данного поведенческого акта. Увеличение до исходных значений частоты повторных выходов после введения L-ДОФА наблюдалось у среднетревожных гонадэктомированных крыс ($p < 0,05$). На остальных животных мадопар влияния не оказал (рис. 2).

Следует отметить, что изменение количества выглядываний из закрытых рукавов у низкотревожных самцов, в ответ на двухнедельную алкоголизацию и последующее введение мадопара, не зависело от андрогенного статуса (рис. 3): к этанолу данный показатель чувствительности не проявил, а введение L-ДОФА привело к сокращению численных значений показателя в 2,4–2,5 ($p < 0,05$) раза, что полностью совпадает с характером изменения маркерного показателя тревожности в условиях данного теста у крыс данной подгруппы тревожности (см. рис. 1).

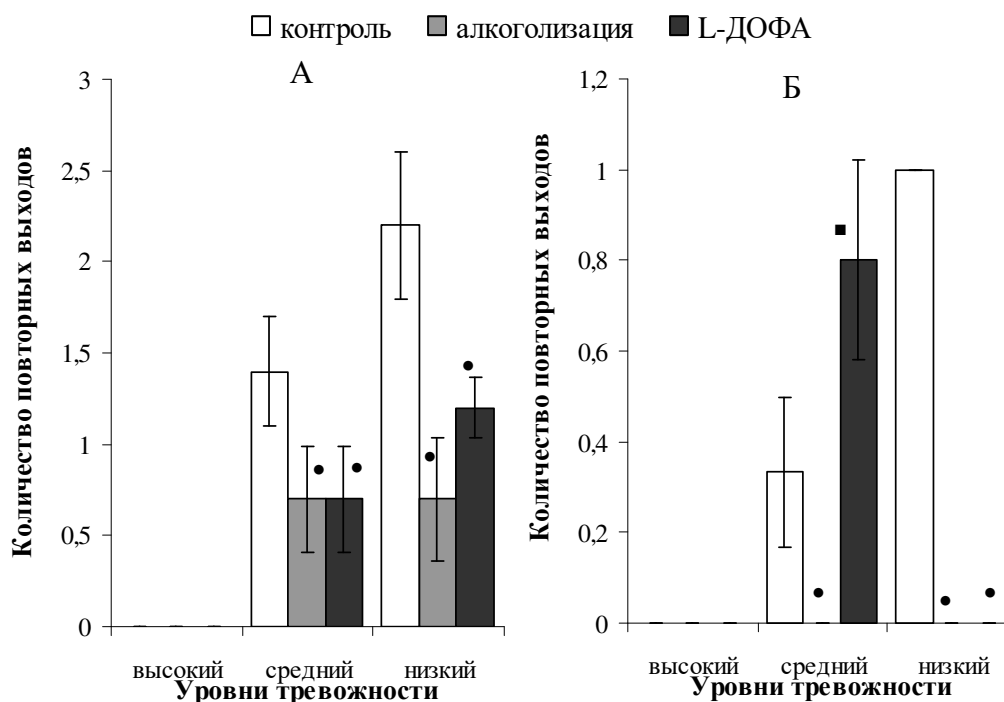


Рис. 2. Характер влияния хронической алкоголизации и последующего введения L-ДОФА на количество повторных выходов на открытое пространство приподнятого крестообразного лабиринта интактных (А) и гонадэктомированных (Б) самцов.

Примечание: ● – различия статистически значимы ($p < 0,05$) при сравнении с исходными значениями; ■ – различия статистически значимы ($p < 0,05$) при сравнении показателей алкоголизации и L-ДОФА.

Что касается изменения эмоциональности в ходе проведения эксперимента, то у интактных крыс достоверных изменений показателя не выявлено, в то время как у гонадэктомированных самцов всех подгрупп тревожности наблюдалось однонаправленное изменение количества фекальных болюсов на всех этапах исследования: алкоголизация привела к росту проявлений эмоциональности (если в исходном тестировании фекальных болюсов у всех самцов выявлено не было, то после введения этанола количество фекальных болюсов у животных составило 1,3–2,0 болюса), а последующее введение L-ДОФА полностью угнетало эмоциональность до ее исходного уровня.

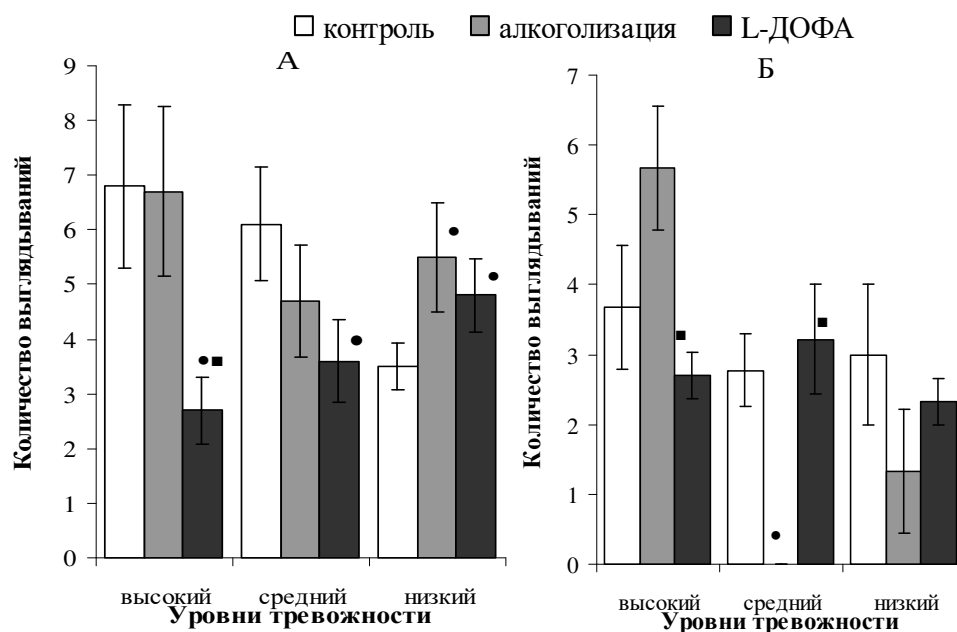


Рис. 3. Характер влияния хронической алкоголизации и последующего введения L-ДОФА на количество повторных выходов на открытое пространство приподнятого крестообразного лабиринта интактных (А) и гонадэктомированных (Б) самцов.

Примечание: ● – различия статистически значимы ($p < 0,05$) при сравнении с исходными значениями; ■ – различия статистически значимы ($p < 0,05$) при сравнении показателей алкоголизации и L-ДОФА.

Характер изменения исследовательской (рис. 4) и двигательной (рис. 5) активности экспериментальных животных с разным андрогенным статусом в продырявленном поле на длительную алкоголизацию не зависел от их исходного уровня тревожности и был однонаправленным. Так, у всех самцов наблюдалось угнетение проявлений данных видов активности. При этом, степень угнетения данных показателей была выше у интактных животных: исследовательская активность у них сократилась в 3,1–6,2 ($p < 0,05$) раза, а двигательная – в 3,3–5,4 ($p < 0,05$) раза, в то время как у гонадэктомированных крыс эти показатели угнетались в 2,9–3,9 и 1,6–2,8 раза, соответственно ($p < 0,05$). Последующее введение L-ДОФА позволило скомпенсировать сокращение исследовательской и двигательной активности у интактных самцов с крайними уровнями тревожности. Однако, исходных значений данные показатели не достигли (см. рис. 4 А, 5 А).

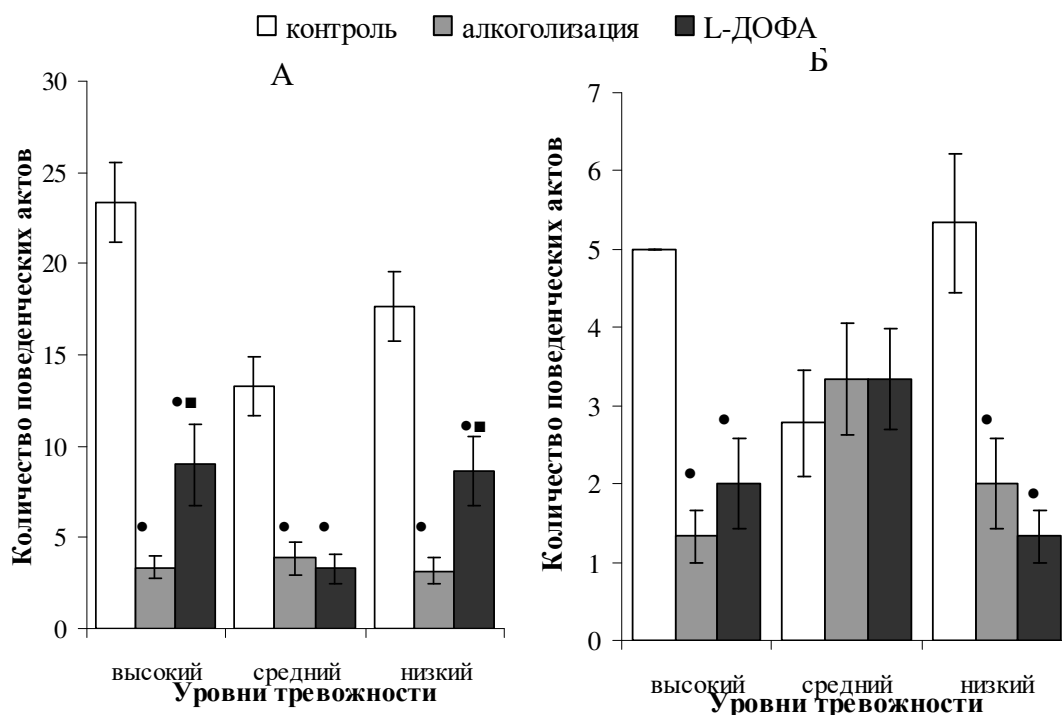


Рис. 4. Характер влияния хронической алкоголизации и последующего введения L-ДОФА на исследовательскую активность в продырявленном поле интактных (А) и гонадэктомированных (Б) самцов.

Примечание: ● – различия статистически значимы ($p < 0,05$) при сравнении с исходными значениями; ■ – различия статистически значимы ($p < 0,05$) при сравнении показателей алкоголизации и L-ДОФА.

У гонадэктомированных алкоголизованных самцов введение L-ДОФА привело к увеличению (в 2,1 раза, $p < 0,05$) двигательной активности только у высокотревожных самцов, на показатели поведенческой активности у крыс остальных подгрупп не повлияло (см. рис. 4 А, 5 А).

Касательно изменения груминговой активности в процессе выполнения исследования, следует отметить тот факт, что в большей степени на частоту актов груминга влиял исходный уровень тревожности животных, чем андрогенный статус. Так, у высокотревожных крыс введение алкоголизированным самцам L-ДОФА приводило к стимуляции грумингового поведения (рис. 6), а у среднетревожных груминг угнетался на фоне инъекций предшественника синтеза дофамина.

Учет изменения показателей поведения той части гонадэктомированных самцов, которые показали в исходном тестировании депрессивно-подобное состояние, выявил следующее. После двухнедельной алкоголизации у всех этих самцов суммарное время пребывания на открытом пространстве лабиринта составляло $29,3 \pm 7,91$ секунду (табл. 2), при этом, повторных выходов на открытое пространство лабиринта и выглядываний из закрытых рукавов выявлено не было.

Показатели, характеризующие исследовательскую, двигательную и груминговую активность в продырявленном поле, от исходных значений не отличались и сохранялись на достаточно низком уровне.

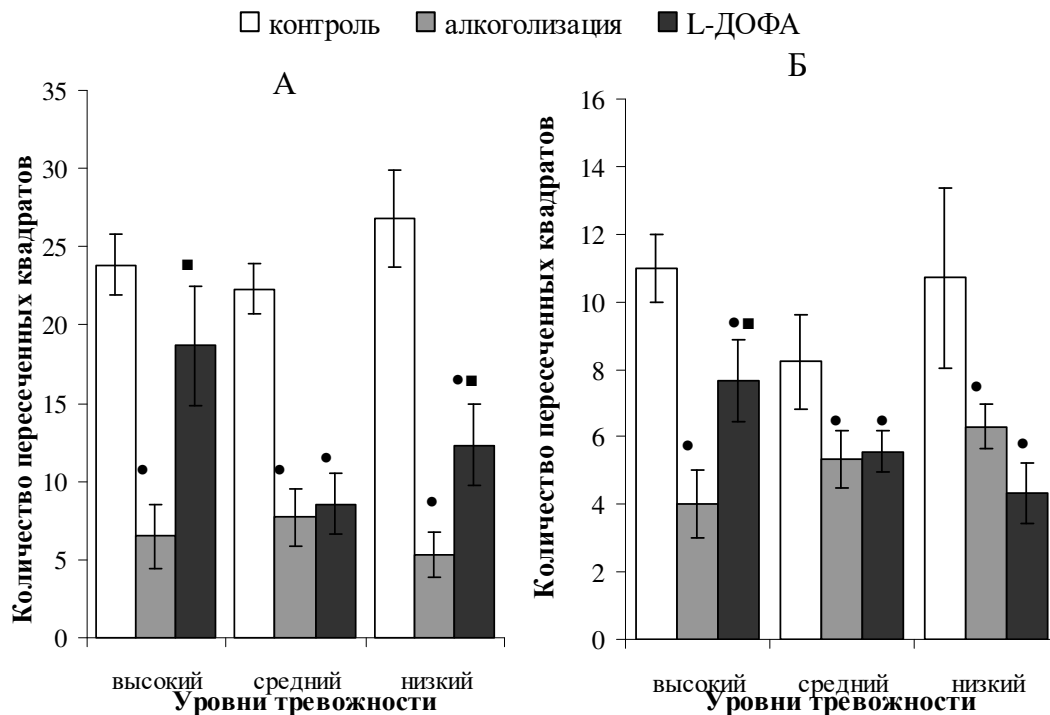


Рис. 5. Характер влияния хронической алкоголизации и последующего введения L-ДОФА на двигательную активность в продырявленном поле интактных (А) и гонадэктомированных (Б) самцов.

Примечание: • – различия статистически значимы ($p < 0,05$) при сравнении с исходными значениями; ■ – различия статистически значимы ($p < 0,05$) при сравнении показателей алкоголизации и L-ДОФА.

Введение L-ДОФА привело к снижению тревожности, на что указывает увеличение времени пребывания животных на открытом пространстве лабиринта в 2,5 раза ($p < 0,05$) и появление в поведенческом репертуаре крыс повторных выходов на открытое пространство. Вместе с тем, у животных появились выглядывания из закрытых рукавов. Показатели поведенческой активности в продырявленном поле достоверно не изменились (см. табл. 2).

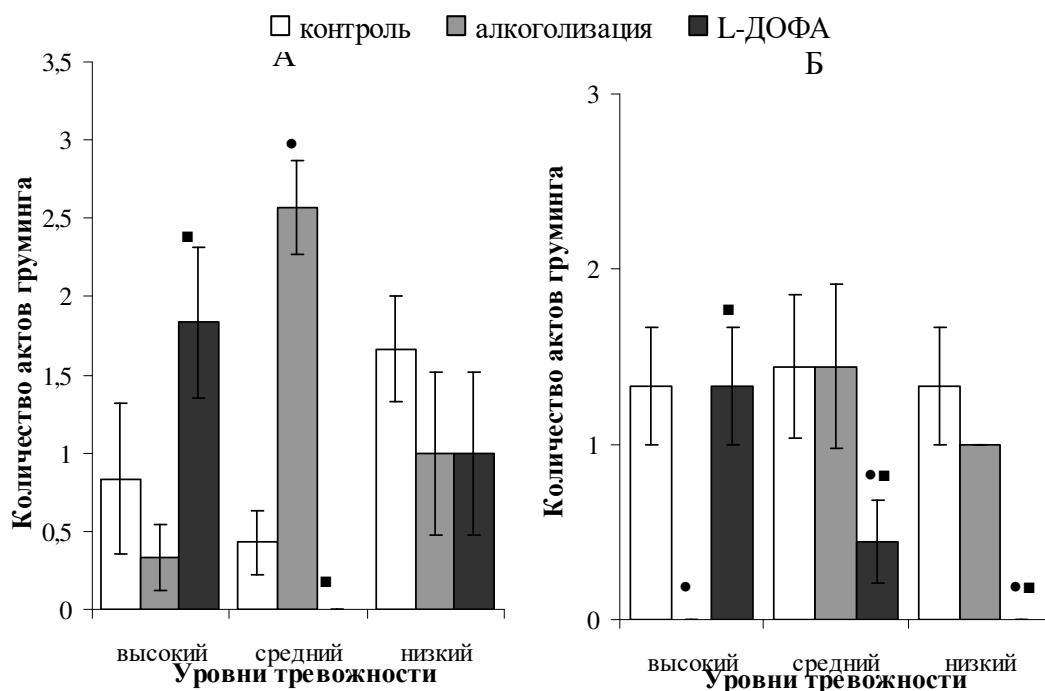


Рис. 6. Характер влияния хронической алкоголизации и последующего введения L-ДОФА на груминговую активность в продырявленном поле интактных (А) и гонадэктомированных (Б) самцов.

Примечание: • – различия статистически значимы ($p < 0,05$) при сравнении с исходными значениями; ■ – различия статистически значимы ($p < 0,05$) при сравнении показателей алкоголизации и L-ДОФА.

Увеличение тревожности, установленное в настоящих исследованиях, у интактных средне- и низкотревожных самцов и гонадэктомированных крыс с исходно низким уровнем тревожности после двухнедельной алкоголизации, подтверждает результаты, полученные Bondarenko O. V. [28], Kovalenko O. A. [29.] и Kushner M. G. [30]. Данный эффект может быть результатом снижения количества нейропептида Y [31], обладающего анксиолитическим действием, а так же, перестройками функциональной активности дофаминергической системы [32, 33] на фоне введения этанола. Устойчивость к алкоголизации высокотревожных самцов как интактных, так и гонадэктомированных, и среднетревожных крыс с дисбалансом андрогенов, указывает на возможно исходно низкий уровень содержания нейропептида Y в мозговых структурах, а так же особенности обмена ряда моноаминов, на что указывают ряд авторов [34–36].

Таблица 2

Поведенческий профиль гонадэктомированных самцов белых крыс, показавших в исходном тестировании депрессивно-подобное состояние ($X \pm m$)

Показатели	Этап исследования		
	контроль	алкоголизация	L-ДОФА
Результаты тестирования в приподнятом крестообразном лабиринте			
Время пребывания на открытом пространстве, с	300,0 $\pm$ 0,00	29,6 $\pm$ 7,91 [•]	73,3 $\pm$ 14,24 ^{•■}
Количество повторных выходов на открытое пространство	0,0	0,0	1,3 $\pm$ 0,33 ^{•■}
Количество выглядываний из закрытых рукавов	0,0	0,0	2,0 $\pm$ 0,58 ^{•■}
Количество фекальных болюсов	0,0	0,0	0,0
Результаты тестирования в продырявленном поле			
Исследовательская активность	1,0 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,0
Двигательная активность	3,0 $\pm$ 0,58	2,7 $\pm$ 0,34	2,7 $\pm$ 0,34
Количество актов груминга	0,0	0,0	0,0

Примечание: ● – различия статистически значимы ($p < 0,05$) при сравнении с исходными значениями; ■ – различия статистически значимы ($p < 0,05$) при сравнении показателей алкоголизации и L-ДОФА.

Резкое сокращение исследовательской активности у всех интактных самцов и дефицитандроженных крыс с крайними уровнями тревожности согласуется с данными, полученными Пахомовой А. О. [1] и Осколок Л. Н. [37]. Из настоящих исследований видно, что пониженный андрогенный статус выступил в качестве протектора угнетающего эффекта этанола на проявления исследовательской активности.

Имеющиеся в литературе сведения о влиянии этанола на двигательную активность весьма противоречивы. Ряд авторов указывают на выраженное сокращение данного вида активности при алкоголизации [38–40], в то время как результаты экспериментов других исследователей показали увеличение проявлений двигательной активности [41]. В настоящих экспериментах нашли подтверждение исследования, указывающие на угнетающую поведенческую активность роль этанола. Вместе с тем, Гребенюк А. Н. с соавт. [42] указывают на тот факт, что длительная алкоголизация в большей степени угнетает исследовательскую активность, чем двигательную, что в некоторой степени противоречит нашим

результатам.

Одним из возможных объяснений полученных на первом этапе исследования результатов может быть способность этанола как мембранотропного вещества оказывать влияние на рецепторы моноаминов, что, в свою очередь, опосредует изменение синтеза и выделения катехоламинергических нейромедиаторов в синаптическую щель [43–45]. Последнее приводит к нарушению функциональной активности нейронных ансамблей структур головного мозга, что влечет развитие недостаточности дофаминергической системы. Снижение функциональной активности дофаминергической системы стимулирует секрецию АКТГ [46] и, как следствие, кортикостерона. В пользу нарушений работы дофаминергической системы, развившихся на фоне алкоголизации, свидетельствует коррекция некоторых показателей психоэмоционального состояния у животных путем введения предшественника синтеза дофамина L-ДОФА.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о наличии определенной зависимости от гонадного статуса организма чувствительности самцов белых крыс к действию этанола и возможности коррекции психоэмоциональных нарушений, вызванных алкоголизацией, с помощью предшественника синтеза дофамина L-ДОФА.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Введение этанола в течение 14 дней приводит к увеличению тревожности в 1,6–2,3 раза у исходно средне- и низкотревожных интактных самцов и в 5,1 раза увеличивает тревожность низкотревожных самцов с дисбалансом андрогенов. Высокотревожные самцы как с нормальным, так и с андрогендефицитным состоянием к этанолу чувствительности не проявляют.
2. Длительная алкоголизация угнетает проявления исследовательской активности в 3,1–6 раз у всех интактных самцов, не зависимо от их исходного уровня тревожности и у гонадэктомированных самцов с крайними уровнями тревожности в 2,9–3,9 раза. Сокращение двигательной активности в результате 14-дневного введения этанола не определяется ни исходным уровнем их тревожности, ни андрогенным статусом. Степень угнетения данного показателя находится в прямой зависимости от функциональной активности гонадной системы.
3. Введение предшественника синтеза дофамина оказало анксиолитический эффект на интактных самцов, не зависимо от их исходного уровня тревожности и позволило скорректировать увеличение тревожности у исходно средне- и низкотревожных животных. У самцов с дефицитом андрогенов L-ДОФА снизил тревожность у высоко- и среднетревожных особей, корректирующего действия на анксиогенный эффект этанола у нетревожных самцов не установлено.
4. Введение L-ДОФА несколько скорректировало угнетение исследовательской и двигательной активности интактных самцов крыс с исходно крайними уровнями тревожности, вызванное хронической алкоголизацией. Введение предшественника синтеза дофамина не оказало достоверного влияния на

показатели исследовательской активности гонадэктомированных алкоголизованных самцов и скомпенсировало сокращение двигательной активности у высокотревожных самцов с дефицитом андрогенов.

5. Двухнедельная алкоголизация не влияет на эмоциональность интактных самцов и стимулирует ее проявления у гонадэктомированных самцов независимо от их исходного уровня тревожности, последующее введение L-ДОФА нормализует показатели эмоциональности у гонадэктомированных животных.

Список литературы

1. Пахомова А. О. Зміна поведінкових реакцій та ліпопероксидних процесів в тканині печінки гостроалкоголізованих щурів при введенні кверцетину протягом 14 діб / А. О. Пахомова, О. А. Коваленко, Т. М. Говоруха, В. М. Бабан, М. Ю. Макачук // Фізика живого. – 2008. – Т. 16, № 1. – С. 105–110.
2. Шабанов П. Д. Основы наркологии / П. Д. Шабанов – СПб.: Лань, 2002. – 560 с.
3. Мхитаров В. А. Морфофункциональная характеристика щитовидной железы крыс Вистар при длительном потреблении алкоголя в условиях свободного выбора / В. А. Мхитаров, О. В. Макарова // Российский медико-биологический вестник им. Академика И. П. Павлова. – 2013. – № 2. – С. 22–29.
4. Кондашевская М. В. Морфофункциональные нарушения аденогипофиза и мужских половых желез при алкоголизме (обзор литературы) / М. В. Кондашевская, В. А. Мхитаров // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2012. – № 2. – С. 66–73.
5. Ponizovskiy P. A. Cognitive status and addiction denial in the early stages of alcohol addiction / P. A. Ponizovskiy, A. G. Gofman // European Psychiatry. – 2017. – Vol. 41, suppl. 1. – P. 874.
6. Николишин А. Е. Алкогольная зависимость и депрессия: дофаминовая медиация и ключ к изучению коморбидности / А. Е. Николишин, А. Г. Гофман, А. Ю. Кибитов // Наркология. – 2016. – № 8. – С. 80–87.
7. Levola J. Health-related quality of life in alcohol dependence: a systematic literature review with a specific focus on the role of depression and other psychopathology / J. Levola, M. Aalto, A. Holopainen, A. Cieza, T. Pitkanen // Nordic Journal of Psychiatry. – 2014. – Vol. 68, № 6. – P. 369–384.
8. Pringuey D. Comorbidity of affective disorders and alcohol use disorder / D. Pringuey, F. Cherikh, S. Lunacek, B. Giordana, E. Fakra, R. Belzeaux, M. Adida, J. M. Azorin // L'Encephale. – 2014. – Vol. 40, № 3. – P. 3–7.
9. Getachew B. Alcohol-induced depressive-like behavior is associated with cortical norepinephrine reduction / B. Getachew, S. R. Hauser, R. E. Taylor, Yo. Tizabi // Pharmacol. Biochem. Behav. – 2010. – V. 96 (4). – P. 395–401.
10. Фролова Г. А. Оценка корректирующего влияния сульпирида на поведенческие нарушения алкоголизованных самцов белых крыс с разным уровнем депрессивности / Г. А. Фролова // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2019. – Т. 63, № 2. – С. 19–28.
11. Исмаилова Х. Ю. Индивидуальные особенности поведения (моноаминергические механизмы) / Х. Ю. Исмаилова, Т. М. Агаев, Т. П. Семенова. – Баку: Нурлан, 2007. – 228 с.
12. Ещенко Н. Д. Биохимия психических и нервных болезней. Избранные разделы: Учеб. пособие для вузов / Н. Д. Ещенко. – Санкт-Петербург: Издательство СПбГУ, 2004. – 200 с.
13. Сашков В. А. Нейроактивные стероиды в мозге и возрастно-половые особенности поведения и тревожности (экспериментальное исследование) / В. А. Сашков, Н. Б. Сельверова, Э. Д. Моренков, И. В. Ермакова // Физиология человека. – 2009. – Т. 35, № 5. – С. 40–46.
14. Mukai H. Hippocampal synthesis of estrogens and androgens which are paracrine modulators of synaptic plasticity: synaptocrinology / H. Mukai, N. Takata, H. T. Ishii, N. Tanabe, Y. Hojo, A. Furukawa, T. Kimoto, S. Kawato // Neuroscience. – 2006. – V. 138, № 3. – P. 757–764.
15. Rupprecht R. Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological properties / R. Rupprecht // Psychopharmacology. – 2003. – Vol. 28, Issue 2. – P. 139–168.

16. Федотова Ю. О. Эффекты стимуляции и блокады D2-дофаминовых рецепторов на поведение гонадэктомированных самцов крыс / Ю. О. Федотова // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 2014. – Т. 100, № 12. – С. 1374–1381.
17. Ахмадеев А. В. Исследование факторов предрасположенности к алкоголизму: сравнительный анализ поведенческих реакций и системы биогенных аминов у предпочитающих и не предпочитающих алкоголь крыс / А. В. Ахмадеев, Л. Б. Калимуллина // Успехи современного естествознания. – 2013. – № 1. – С. 35–38.
18. Голоенко И. М. Генетические факторы предрасположенности к алкоголизму / И. М. Голоенко, Н. Г. Даниленко, А. В. Копытов, М. Г. Синявская // Здоровоохранение. – 2010. – № 8. – С. 25–28.
19. Sergutina A. V. The effects of L-DOPA on glutamate dehydrogenase activity in the cerebral neurons of rats with different motor activities / A. V. Sergutina // Neurochemical Journal. – 2010. – V. 4 (1). – P. 25–29.
20. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под ред. А. Н. Миронова, Н. Д. Бунатян. – Москва: Минздрав РФ, ЗАО «Гриф и К», 2012. – 944 с.
21. Буреш Я. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Я. Буреш, О. Бурешова, Д. П. Хьюстон. – Москва: Высшая школа, 1991. – 399 с.
22. Амикишиева А. В. Поведенческое фенотипирование: современные методы и оборудование / А. В. Амикишиева // Вестник ВОГиС. – 2009. – Т. 13 (3). – С. 529–542.
23. Шаляпина В. Г. Изменение приспособительного поведения активных и пассивных крыс вистар в водно-иммерсионной модели депрессии / В. Г. Шаляпина, Е. А. Вершинина, В. В. Ракицкая // Журнал ВНД им. И. П. Павлова. – 2006. – № 4. – С. 543–547.
24. Сапронов Н. С. Влияние L-триптофана на условный рефлекс активного избегания у крыс-самцов с повышенным уровнем тестостерона / Н. С. Сапронов, Ю. О. Федотова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2000. – № 7. – С. 67–69.
25. Индутный А. В. Метаболические предпосылки интолерантности к алкоголю в условиях стресса. Автореф. дисс. на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. / Индутный А. В. – Омск, 1997. – 22 с.
26. Воронков Д. Н. Морфофункциональные изменения нейронов и нейроглии в нигростриатных образованиях мозга при моделировании дисфункции дофаминергической системы. Автореф. дисс. на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. / Воронков Д. Н. – Москва, 2012. – 26 с.
27. Киршенблат Я. Д. Общая эндокринология: уч. пособие для студентов университетов / Я. Д. Киршенблат. – М.: Высшая школа, 1965. – 316 с.
28. Bondarenko O. V. Effects of N-stearoyl ethanolamine on anxiety-like behavioral reactions of rats after chronic alcoholization / O. V. Bondarenko, N. M. Hula, M. Yu. Makarchuk, T. M. Horid'ko // Biologija. – 2014. – Vol. 60, № 1. – P. 23–31.
29. Kovalenko O. A. Influence of behavioral reactions on ability to training of rats with different degree of alcoholic motivation / O. A. Kovalenko, E. M. Ovcharyk, O. V. Bondarenko, M. Yu. Makarchuk // Visnyk of Luhansk National Taras Shevchenko University: Medical sciences. – 2010. – 21(208). – P. 54–59.
30. Kushner M. G. The relationship between anxiety disorders and alcohol use disorders: a review of major perspectives and findings / M. G. Kushner, K. Abrams, C. Borchardt // Clin Psychol Rev. – 2000. – V. 20(2). – P. 149–171.
31. Сметанин В. А. Влияние этанола на уровень нейропептидов в организме / В. А. Сметанин, Ж. С. Бардинова, О. П. Петрушова, М. Т. Генгин // Известия ПГПУ им. В. Г. Белинского. – 2008. – № 10 (14). – С. 49–53.
32. Пивоварчик М. В. Участие опиоидной и дофаминовой систем мозга в реализации аддиктивных свойств этанола / М. В. Пивоварчик // Журнал ГГМУ. – 2003. – № 4. – С. 3–6.
33. Лебедев А. А. Реакция клеток мезокортиколимбической дофаминергической системы мозга на длительную алкоголизацию у крыс / А. А. Лебедев, А. В. Дробленков, П. Д. Шабанов // Психофармакология и биологическая наркология. – 2008. – Т. 8, № 4. – С. 2453–2456.
34. Федотова Ю. О. Особенности обмена моноаминов в головном мозге молодых и старых гипотиреоидных самцов крыс / Ю. О. Федотова, О. О. Масалова // Нейрохимия. – 2010. – Т. 27, № 1. – С. 25–30.

35. Лелевич С. В. Нейромедиаторные нарушения в головном мозге крыс при острой алкогольной интоксикации / С. В. Лелевич, В. В. Лелевич, Е. М. Дорошенко // Нейрохимия. – 2010. – Т. 27, № 2. – С. 159–163.
36. Золотухин М. М. Влияние комбинированного введения L-триптофана и вальпроевой кислоты на показатели гидроксизазного пути обмена триптофана в эпифизе крыс на интактном фоне и при хронической алкогольной интоксикации / М. М. Золотухин, Е. М. Дорошенко, В. Ю. Смирнов // Рецепт. – 2009. – № 1 (63). – С. 60–65.
37. Осколок Л. Н. Патологические аспекты хронического алкоголизма, наркомании и токсикомании / Л. Н. Осколок, А. А. Терентьев // Фундаментальные исследования. – 2011. – №10. – С. 340–344.
38. Пурсанов К. А. Влияние гепарина на гиподинамию крыс, вызванную этиловым спиртом / К. А. Пурсанов, А. Е. Хомутов, В. С. Слободенюк, А. В. Бочкарева // Медицинский альманах. – 2009. – №1 (6). – С. 127–128.
39. Тюренков И. Н. Влияние фенибута на поведение животных в условиях добровольной хронической алкоголизации / И. Н. Тюренков, А. В. Воронков, Л. Е. Бородин // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2005. – Т. 68, №3. – С. 42–45.
40. Тригуб М. М. Влияние агонистов опиоидных рецепторов периферического действия на депрессивный эффект этанола / М. М. Тригуб, Н. Г. Богданова, А. А. Колпаков, В. Г. Башкатова, С. К. Судаков // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т. 156, №12. – С. 741–744.
41. Богданова С. А. Характер влияния сульпирида на показатели поведения гонадэктомизированных самцов белых крыс в батарее тестов в зависимости от исходного уровня активности в открытом поле / С. А. Богданова, Г. А. Фролова // Ученые записки Крымского федерального университета им. В. И. Вернадского. Биология. Химия. – 2018. – Т. 4 (70), №4. – С. 3–18.
42. Гребенюк А. Н. Экспериментальная оценка нейротоксических эффектов этанола и их коррекция пептидными препаратами / А. Н. Гребенюк, В. Л. Рейнюк, Д. А. Халютин, Е. В. Давыдова, А. А. Ховпачев // Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях. – 2014. – №3. – С. 70–77.
43. Шабанов П. Д. Психофармакология / П. Д. Шабанов. – СПб.: Элби-СПб, 2008. – 416 с.
44. Семке В. Я. Нейробиологические механизмы алкоголизма / В. Я. Семке, Т. Н. Мельникова, Н. А. Бохан // Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. – 2002. – Т. 102. (8). – С. 61–66.
45. Шабанов П. Д. Влияние пептидов, вводимых в центральное ядро миндалины, на самостимуляцию латерального гипоталамуса у крыс при хронической алкоголизации / П. Д. Шабанов, А. А. Лебедев, В. П. Павленко // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2006. – Т. 69 (5). – С. 44–49.
46. Ogilvie K. M. Gender difference in alcohol-evoked hypothalamic-pituitary-adrenal activity in the rat: ontogeny and role of neonatal steroids / K. M. Ogilvie, C. Rivier // Alcohol. Clin. Exp. Res. – 1996. – V. 20 (2). – P. 255–261.

MODIFICATIONS OF ANXIETY BEHAVIOR IN ALCOHOLIZED MALE WHITE RATS WITH ANDROGEN IMBALANCE DURING DOPAMINERGIC SYSTEM STIMULATION WITH MADOPAR

Frolova G. A., Chetveric A. V., Paramonova A. K.

*Donetsk national university, Donetsk, Ukraine
E-mail: gal_alex_frolova@mail.ru*

Research objective consisted in the studying of the possible corrective effect of the precursor of dopamine synthesis (madopar) on some psychoemotional indicators of

alcoholized male white rats with androgen imbalance.

Method. The experiment is executed on 80 sexually mature rats-males (160–180 g).

The anxiety level of rats was determined in the elevated plus-maze by the total time of stay of the animal in the open space of the maze for 5 minutes of testing, the frequency of repeated outputs on it, the number of peeks from closed sleeves. The number of fecal boluses was tried about emotional animals. Locomotor and exploratory activity, grooming behavior of animals was assessed using hole board within 5 minutes. After the initial (control) test battery in the above test animals were divided into three subgroups according to the severity of anxiety level in the elevated plus maze. Alcoholization was carried out for 14 days by intraperitoneal injection of a solution of ethanol in a 10 % solution at the rate of 2 g/kg of animal weight, after which the animals were again tested. The dopaminergic system was stimulated by introducing a precursor of dopamine synthesis – L-DOPA (madopar) at a dose of 50 mg/kg intraperitoneally for 14 days. The androgen imbalance was modeled by bilateral gonadectomy performed under ether anesthesia according to the method of Kirshenblatt.

Results. It was established that L-DOPA had an anxiolytic effect on intact males, regardless of their initial level of anxiety, and allowed us to correct the increase in anxiety in initially medium and low anxiety animals. In males with androgen deficiency, L-DOPA reduced anxiety in high- and medium-anxiety rats; no corrective effect on the anxiogenic effect of ethanol in non-anxious males has been established. Madopar corrected the inhibition of the research and motor activity of intact male rats with initially extreme levels of anxiety caused by chronic alcoholization. The introduction of the precursor of dopamine synthesis did not have a significant effect on the indices of the research activity of gonadectomized alcoholized males and compensated for the reduction in motor activity in highly anxious males with androgen deficiency.

Conclusion. Thus, the obtained results indicate the presence of a certain dependence on the gonadal status of the organism of the sensitivity of male white rats to the action of ethanol and the possibility of correction of psychoemotional disorders caused by alcoholization using the precursor of dopamine synthesis – L-DOPA.

Keywords: anxiety, exploratory activity, motor activity, emotionality, L-DOPA, dopamine, ethanol.

References

1. Pahomova A. O., Kovalenko O. A., Govoruha T. M., Baban V. M., Makarchuk M. Yu. Change of behavioral reactions and lipoperoxidation processes in liver in strongly alcoholised rats under introduction of quercetin during 14 days, *Physics of the alive*, **16** (1), 105 (2008) (In Ukrainian)
2. Shabanov P. D. *Osnovy narkologii (Fundamentals of narcology)*, 560p. (St. Petersburg: Lan, 2002) (In Russian)
3. Mkhitarov V. A., Makarova O. V. Morphofunctional characteristics of thyroid gland of male wistar rats in case of prolonged alcohol consumption under the conditions of voluntary intake, *Formely I.P. Pavlov Russian medicobiological Proceedings*, **2**, 22 (2013) (In Russian)
4. Kondashevskaya M. V., Mkhitarov V. A. Impaired structure and function of adenohypophysis and male gonads under the conditions of alcoholism (review), *Clinical and experimental morphology*, **2**, 66 (2012) (In Russian)
5. Ponizovskiy P. A., Gofman A. G. Cognitive status and addiction denial in the early stages of alcohol addiction, *European Psychiatry*, **41** (1), 874 (2017).

6. Nikolishin A. E., Gofman A. G., Kibitov A. Yu. Alcohol dependence and depression: dopamine neuromediation as the clue to the study of comorbidity, *Narkology*, **15** (8), 80 (2016) (In Russian)
7. Levola J., Aalto M., Holopainen A., Cieza A., Pitkänen T. Health-related quality of life in alcohol dependence: a systematic literature review with a specific focus on the role of depression and other psychopathology, *Nordic Journal of Psychiatry*, **68** (6), 369 (2014).
8. Pringuey D., Cherikh F., Lunacek S., Giordana B., Fakra E., Belzeaux R., Adida M., Azorin J. M. Comorbidity of affective disorders and alcohol use disorder, *L'Encephale*, **40** (3), 3 (2014).
9. Getachew B., Hauser S. R., Taylor R. E., Tizabi Yo. Alcohol-induced depressive-like behavior is associated with cortical norepinephrine reduction, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **96** (4), 395 (2010).
10. Frolova G. A. The sulpiride correction of behavioral disorders in alcoholized white male rats with different degrees of depression, *Pathological physiology and experimental therapy*, **2**, 19 (2019). (In Russian)
11. Ismailova H. Yu., Agaev T. M., Semenova T. P. *Individual'nye osobennosti povedeniya (monoaminergicheskie mehanizmy) (Specific features of behavior (monoaminergic mechanisms))*, 228p. (Bak: Nyrlan, 2007). (In Russian)
12. Eshenko N. D. *Biohimia psikhicheskikh i nervnih bolezney. Izbrannie razdeli (Biochemistry of psychic and nervous diseases. Chosen sections)*, 200 p. (St. Petersburg: St. Petersburg State University, 2004). (In Russian)
13. Sashkov V. A., Sel'verova N. B., Ermakova I. V., Morenkov E. D. Neuroactive steroids in the brain and age and sex specificity of behavior and anxiety: An experimental study, *Human Physiology*, **5**, 556 (2009). (In Russian)
14. Mukai H., Takata N., Ishii H. T., Tanabe N., Hojo Y., Furukawa A., Kimoto T., Kawato S. Hippocampal synthesis of estrogens and androgens which are paracrine modulators of synaptic plasticity: synaptocrinology, *Neuroscience*, **3**, 757 (2006).
15. Rupprecht R. Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological properties, *Psychopharmacology*, **28**, 139 (2003).
16. Fedotova Yu. O. Effects of stimulation and blockade of D2-dopaminergic receptors on behavior in gonadectomized male rats, *Neuroscience and Behavioral Physiology*, **5**, 544 (2016).
17. Akhmadeev A. V., Kalimullina L. B. Study of factors predisposition to alcoholism: a comparative analysis of behaviors and biogenic amines in the alcohol-preferring rats and non-preferring rats, *Advances in current natural sciences*, **1**, 35 (2013). (In Russian)
18. Goloenko I. M., Danilenko N. G., Kopytov A. V., Sinyavskaya M. G. Genetic factors of alcohol abuse predisposition, *Healthcare*, **8**, 25(2010) (In Russian)
19. Sergutina A. V. The effects of L-DOPA on glutamate dehydrogenase activity in the cerebral neurons of rats with different motor activities, *Neurochemical Journal*, **4** (1), 25 (2010).
20. Mironova A. N., Bunatyan N.D. (reds.), *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv (Guide to carrying out preclinical trials of medicines)*, 944 p. (Moscow: Minzdrav RF, ZAO «Grif i K», 2012). (In Russian).
21. Buresh Ja., Bureshova O., Huston D. P. *Metodiki i osnovnye jeksperimenty po izucheniju mozga i povedeniya (Techniques and the basic experiments for the study of a brain and behavior)*, 399p. (Moscow: Higher School, 1991). (In Russian)
22. Amikishieva A. V. Behavioral phenotyping: up-to-date methods and equipment, *Proceedings VOGiS*, **13** (3), 259 (2009). (In Russian)
23. Shalyapina V. G., Vershinina E. A., Rakitskaya V. V., Rizhova L. Yu. Alteration of Active and Passive Wistar Rats Adaptive Behavior in Water-Immersion Model of Depression, *I. P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity*, **36** (4), 543 (2006). (In Russian)
24. Sapronov N. S., Fedotova Yu. O. Effect of L-tryptophan on active avoidance response in male rats with increased testosterone level, *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, **129** (7), 67 (2000). (In Russian)
25. Indutnyj A. V. *Metabolic prerequisites of intolerance to alcohol in the conditions of a stress*. Avtoref. diss. s for a degree of the candidate of medical sciences, 22p. (Omsk, 1997). (In Russian)
26. Voronkov D. N. *Morphofunctional changes in neurons and neuroglia in nigrostriatal formations of the brain when modeling dysfunction of the dopaminergic system*. Avtoref. diss. s for a degree of the candidate of medical sciences, 26p. (Moscow, 1997). (In Russian)
27. Kirshenblat Ya. D. *Obshaya endokrinologiya (General endocrinology)*, 316p. (Moscow: Visshaya shkola, 1965). (In Russian)

28. Bondarenko O. V., Hula N. M., Makarchuk M. Yu., Horid'ko T. M. Effects of N-stearoylethanolamine on anxiety-like behavioral reactions of rats after chronic alcoholization, *Biology*, **60** (1), 23 (2014).
29. Kovalenko O. A., Kovalenko O. A., Ovcharyk E. M., Bondarenko O. V., Makarchuk M. Yu. Influence of behavioral reactions on ability to training of rats with different degree of alcoholic motivation, *Proceedings of Taras Shevchenko Luhansk National University: Medical sciences*, **21** (208), 54 (2010).
30. Kushner M. G., Abrams K., Borchardt C. The relationship between anxiety disorders and alcohol use disorders: a review of major perspectives and findings, *Clin Psychol Rev.*, **20** (2), 149 (2000).
31. Smetanin V. A., Bardinova Zh. S., Petrushova O. P., Gengin M. T. Influence of ethanol on the level of neuropeptides in the organism. *Formely V. G. Belinsky PSPU News*, **10** (14), 49 (2008). (In Russian)
32. Pivovarchik M. V. Participation of opioid and dopamine systems of the brain in the implementation of the addictive properties of ethanol, *Zhurnal GGMU*, **4**, 3 (2003). (In Russian)
33. Lebedev A. A., Droblenkov A. V., Shabanov P. D. Cell Reaction of the Brain Mesocorticolimbic Dopaminergic System on Chronic Alcoholization in Rats, *Psychopharmacol biol narcot*, **8** (3-4). 2453 (2008). (In Russian)
34. Fedotova Y. O., Masalova O. O. Specific monoamine exchange in the brains of young and aged male rats with hypothyroidism, *Neurochemical Journal*, **4** (1), 19 (2010)
35. Lelevich S. V., Lelevich V. V., Doroshenko E. M. Neurotransmitter changes in rat brain following acute alcohol intoxication, *Neurochemical Journal*, **4** (2), 137 (2010).
36. Zolotuhin M. M., Doroshenko E. M., Smirnov V. Yu. Influence of the combined introduction of L-tryptophane and valproic acid on indicators of a gidroxilic way of exchange of tryptophane in an epiphysis of rats on an intact background and at chronic alcoholic intoxication, *Prescription*, **1** (63), 60 (2009)/ (In Russian)
37. Oskolok L. N., Terentiev A. A. Pathophysiological aspects of chronic alcoholism, drug addiction and toxicomania, *Fundamental research*, **10**, 340 (2011). (In Russian)
38. Pursanov K. A., Homutov A. E., Slobodenuk V. S., Bochkareva A. V. Influence of heparin on rats' hypodynamia caused by ethyl alcohol, *Medical almanac*, **1** (6), 127 (2009). (In Russian)
39. Tyurenkov I. N., Voronkov A. V., Borodkina L. E. Effect of phenibut on the behavior of experimental animals under conditions of voluntary chronic alcoholism, *Russian Journal of Experimental and Clinical Pharmacology*, **68** (3), 42 (2005). (In Russian)
40. Trigub M. M., Bogdanova N. G., Kolpakov A. A., Bashkatova V. G., Sudakov S. K. The influence of agonists of opioid receptors in peripheral actions on the depressive effect of ethanol, *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, **156** (12), 741 (2013) (In Russian)
41. Bogdanova S. A., Frolova G. A. The nature of the effect of sulpiride on the behavior indicators of gonadectomized male white rats in the test battery, depending on the initial level of activity in the open field, *Uchenie zapiski Krimskogo federalnogo yniversiteta im. V. I. Vernadskogo. Biologiya. Chimiya*, **4**, 3 (2018). (In Russian)
42. Grebenyuk A. N., Reinyuk V. L., Khalyutin D. A., Davydova E. V., Khovpachev A. A. Experimental evaluation of neurotoxic effects of ethanol and their correction by peptide preparations, *Medical-Biological and Socio-Psychological Problems of Safety in Emergency Situations*, **3**, 70 (2014). (In Russian)
43. Shabanov P. D. *Psihofarmakologija (Psychopharmacology)*, 416 p. (St. Petersburg: Elbi- StP, 2008). (In Russian)
44. Semke V. Ja., Melnikova T. N., Bohan N. A. Neurobiological mechanisms of alcoholism, *Neuroscience and Behavioral Physiology*, **102** (8), 61 (2002). (In Russian)
45. Shabanov P. D., Lebedev A. A., Pavlenko V. P. Effect of peptides introduced into the central nucleus of amygdala on the hypothalamic self-stimulation in chronically alcoholized rats, *Russian Journal of Experimental and Clinical Pharmacology*, **69** (5), 44 (2006). (In Russian)
46. Ogilvie K. M., Rivier C. Gender difference in alcohol-evoked hypothalamic-pituitary-adrenal activity in the rat: ontogeny and role of neonatal steroids, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **20** (2), 255 (1996).

УДК 615.212.3:591.044:591.181:611.81:612.822:612.829

НЕЙРОТРОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ САЛИЦИЛАТОВ: ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ

***Черетаев И. В., Хусаинов Д. Р., Кореньюк И. И., Чуян Е. Н., Раваева М. Ю.,
Шульгин В. Ф., Гусев А. Н.***

*Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», Симферополь, Республика Крым, Россия
E-mail: cheretaev86@yandex.ru*

В обзоре обобщены современные литературные данные и результаты собственных исследований о физиологических механизмах нейротропных эффектов салицилатов, многие из которых используются в качестве нестероидных противовоспалительных средств. На примере салициловой и ацетилсалициловой кислот и их производных показано, что салицилаты в различных концентрациях оказывают влияние на электрические потенциалы нейронов моллюсков и млекопитающих, процессы синаптической передачи. Эффекты салицилатов существенно изменяются и модифицируются в условиях введения в состав молекулы различных щелочных металлов (натрий) и металло-комплексобразователей (кобальт, цинк). В реализации нейротропных эффектов салицилатов задействованы различные механизмы управления функциональным состоянием нервной клетки: ионные, нейромедиаторные и сигнальные.

Ключевые слова: нейротропные эффекты, салицилаты, физиологические механизмы.

ВВЕДЕНИЕ

Распространенной проблемой у людей современного общества являются патологии, связанные с функционированием различных элементов нервной системы, болевые синдромы [1, 2], что предопределяет необходимость поиска новых эффективных нейротропных веществ и изучения механизма их действия.

Кандидатами на роль таких относительно безопасных средств по сравнению с традиционными нейротропными средствами могут быть представители ненаркотических анальгетиков – салицилаты [3]. Например, достаточно давно было обнаружено, что аспирин способен оказывать угнетающий эффект на нейроны ЦНС, который не является хорошо выраженным, но данный препарат крайне эффективен как средство профилактики депрессий и стресса [3]. В дальнейшем сведения о нейротропных эффектах салицилатов и их физиологических механизмах существенно расширились.

Цель данного обзора – обобщить современные литературные данные о нейротропных эффектах салицилатов и результаты собственных исследований и исследований коллег, проводившихся по данной тематике в течение более 15 лет на кафедре физиологии человека и животных и биофизики Таврической академии в

лаборатории визуализированного пЭТЧ-клампа (до 2015 г. в лаборатории исследования нейронной активности).

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРНЫХ ДАННЫХ

Нейротропные эффекты салициловой и ацетилсалициловой кислот.

В ряде работ [4–14] показано, что салициловая и ацетилсалициловая кислоты существенно изменяют электрические потенциалы нейронов ППа1 и ППа2, а также неидентифицированных клеток висцерального и правого париетального ганглиев моллюска *Helix albescens* Rossm., принадлежащего к роду *Helix*, представители которого широко используется в физиологических экспериментах при фармакологическом скрининге воздействия различных химических веществ [15, 16]. Пороговая концентрация салициловой кислоты, при которой проявляются изменения параметров электрической активности нейронов, составляет 10^{-4} моль/л, а ацетилсалициловой кислоты – $5 \cdot 10^{-6}$ моль/л. Салициловая кислота в концентрации 10^{-3} моль/л угнетает, а в концентрации 10^{-2} моль/л обратимо подавляет импульсную активность нейронов на фоне глубокой гиперполяризации мембраны [5–8, 10, 11].

Аналогичные эффекты были выявлены и в отношении ацетилсалициловой кислоты [9, 11–14]. В данных работах было показано, что ацетилсалициловая кислота в концентрациях $5 \cdot 10^{-5}$ и $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л неселективно угнетает показатели электрических потенциалов нейронов ППа 1 и ППа2 и неидентифицированных клеток висцерального и правого париетального ганглиев моллюска *Helix albescens* Rossm, а в концентрации $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л прекращает генерацию ими импульсов, оказывая токсическое действие. Эффекты всех этих концентраций были обратимы. Изменения скоростей нарастания суммарных трансмембранных ионных токов свидетельствуют о том, что механизм угнетающих эффектов концентраций $5 \cdot 10^{-5}$ и $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л ацетилсалициловой кислоты на нейроны обусловлен уменьшением проницаемости их мембран для Na^+ и увеличением (в концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л) или уменьшением (в концентрации $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л) – для K^+ . Замедление ионных токов, обеспечивающих генерацию потенциала действия (ПД) обуславливает токсическое действие ацетилсалициловой кислоты в концентрации $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л.

В работах [6, 9–14] были высказаны аргументы в пользу того, что обнаруженные на моллюсках *Helix albescens* Rossm. нейротропные эффекты салициловой и ацетилсалициловой кислот обусловлены нарушением функционирования каналов выходящего калиевого и входящего хлорного тока, угнетением биосинтеза АТФ. Не исключено и блокирующее действие этих кислот на кальциевые каналы входящего тока [9–14].

Выяснено также, что салициловая и ацетилсалициловая кислоты замедляют синаптическую передачу в центральной нервной системе (ЦНС) моллюска *Helix albescens* Rossm. [7, 8, 13]. Следует отметить, что в работах [17, 18] в экспериментах на переживающих срезах гиппокампа новорождённых крысят (возраст 4–8 дней) на нейронах СА3 области методом «whole cell» пЭТЧ-кламп регистрации показано, что аспирин оказывает активационное и синхронизирующее действие на спонтанные ГАМК-обусловленные сетевые ответы: в концентрации 10^{-3} моль/л он увеличивает амплитуду и снижает длительность этих ответов, а в концентрации 10^{-2} моль/л –

значительно увеличивает их частоту и снижает амплитуду и длительность. Это исследование позволило подтвердить на млекопитающих ранее высказанную в экспериментах на моллюсках гипотезу об участии входящего хлорного тока в механизме угнетающего нейротропного эффекта ацетилсалициловой кислоты и показало универсальность механизмов действия данного вещества в отношении нейронов ЦНС как позвоночных, так и беспозвоночных животных.

Более подробно нейротропные эффекты этих кислот и их физиологические механизмы в зависимости от применяемой концентрации показаны в табл.

Таблица

Физиологические механизмы нейротропного действия салицилатов, обнаруженные в экспериментах на моллюсках *Helix albescens* Rossm. [4–14]

Вещество	Концентрация, моль/л	Эффект	Механизм
Салициловая кислота	10^{-3}	Увеличение длительности ПД и следовой гиперполяризации	Замедление ионных токов, обеспечивающих соответствующие процессы, угнетение синтеза АТФ
	10^{-2}	Гиперполяризация и полное угнетение импульсной активности	Угнетение ионных токов, обеспечивающих генерацию ПД, усиление входящих хлорных и выходящих калиевых токов, угнетение синтеза АТФ
Салицилат кобальта	10^{-3}	Активационно-модулирующий: возникновение или усиление осцилляций МП, наведение или усиление пачечного ритма генерации ПД. При сохранении мономодального ритма – увеличение ЧГИ	Стимуляция системы синтеза циклических нуклеотидов – цАМФ и цГМФ
	10^{-2}	Деполаризация, существенное снижение амплитуды ПД и увеличение его длительности	Активация метаботропного входящего натриевого тока, стимуляция синтеза цАМФ. Замедление ионных токов, обеспечивающих генерацию ПД

Продолжение таблицы

Салицилат цинка	10^{-3}	Активационно-модулирующий: возникновение или усиление осцилляций МП, наведение или усиление пачечного ритма генерации ПД. При сохранении мономодального ритма – увеличение ЧГИ	Стимуляция системы синтеза циклических нуклеотидов – цАМФ и цГМФ
	10^{-2}	Деполаризация, существенное снижение амплитуды ПД и увеличение его длительности	Активация метаболического входящего натриевого тока, стимуляция синтеза цАМФ. Замедление ионных токов, обеспечивающих генерацию ПД
		Активационно-модулирующий: возникновение или усиление осцилляций МП, наведение или усиление пачечного ритма генерации ПД. При сохранении мономодального ритма – увеличение ЧГИ	Стимуляция системы синтеза циклических нуклеотидов – цАМФ и цГМФ
Ацетил-салициловая кислота	$5 \cdot 10^{-5}$	Обратимое угнетение показателей ПД нейронов	Уменьшение скорости нарастания входящих трансмембранных ионных токов (снижается проницаемость мембраны для Na^+) и увеличение скорости нарастания выходящих трансмембранных ионных токов (увеличивается проницаемость мембраны для K^+)
	$5 \cdot 10^{-4}$		Уменьшение скорости нарастания входящих и выходящих трансмембранных ионных токов (снижается проницаемость мембраны для Na^+ и K^+)
	$5 \cdot 10^{-3}$	Обратимое прекращение генерации ПД	Замедление ионных токов, обеспечивающих генерацию ПД

Продолжение таблицы

Ацетилсалицилат кобальта, ацетилсалицилат цинка	$5 \cdot 10^{-5}$	Обратимое активационно- модулирующее действие на параметры ПД; возникновение или усиление осцилляций МП, наведение или усиление пачечного ритма генерации ПД. При сохранении мономодального ритма – увеличение ЧГИ.	Увеличение скорости нарастания входящих трансmemбранных ионных токов (увеличивается проницаемость мембраны для Na^+) и снижение скорости нарастания выходящих трансmemбранных ионных токов (снижается проницаемость мембраны для K^+)
	$5 \cdot 10^{-4}$	Инициация генерации импульсной активности у фоновонеактивных нейронов ($5 \cdot 10^{-3}$ моль/л)	Увеличение скорости нарастания входящих и выходящих трансmemбранных ионных токов (увеличение проницаемости мембраны для Na^+ и K^+)
	$5 \cdot 10^{-3}$		Снижение скорости нарастания входящих трансmemбранных ионных токов (снижается проницаемость мембраны для Na^+) и увеличение скорости нарастания выходящих трансmemбранных ионных токов (увеличивается проницаемость мембраны для K^+)

Примечание: ПД – потенциал действия, МП – мембранный потенциал, ЧГИ – частота генерации импульсов, цАМФ – циклический аденозинмонофосфат, цГМФ – циклический гуанозинмонофосфат.

В работе [19] показано, что нейротропное действие ацетилсалициловой кислоты реализуется и в диапазоне сверхмалых концентраций (10^{-12} , 10^{-14} и 10^{-17} моль/л), что проявлялось в смене мономодальной ритмической активности нейронов медленной пачечной активностью. При этом достоверно снижались амплитуда, частота и длительность ПД, а также скорость нарастания трансmemбранных ионных токов на фоне гиперполяризации мембранного потенциала (МП). Обнаруженные эффекты ацетилсалициловой кислоты в сверхмалых концентрациях повторяли эффекты более высоких концентраций (10^{-2} , 10^{-3} и 10^{-4} моль/л), однако их угнетающий эффект был менее выражен на фоне модулирующего действия ацетилсалициловой кислоты. После отмывания у

нейронов восстанавливались фоновые показатели электрической активности, при этом в сверхмалых концентрациях ацетилсалициловая кислота обладала менее выраженной токсичностью по сравнению с диапазоном концентраций от 10^{-5} до 10^{-2} моль/л.

Особый интерес представляет изучение роли ацетилсалициловой кислоты и её производных в качестве противоэпилептического средства. Это связано с тем, что угнетающие мембранотропные эффекты этого вещества (в том числе замедляющее действие на трансинаптическую передачу), а также ряд других общеизвестных свойств этой кислоты (противовоспалительное, ингибирование внутриклеточного синтеза АТФ) удовлетворяют основным критериям противосудорожных средств, которые используются в фармакологической практике [20–22]. Кроме того, есть сведения [23], что салициловая и ацетилсалициловая кислоты проявляют церебропротекторные и антиоксидантные свойства, которые основаны на связывании с сульфгидрильными группами мембранных белков и предотвращении перекисного окисления липидов и апоптоза клеток, вызванного свободнорадикальным повреждением их лизосом. Известно, что патологические процессы перекисного окисления и саморазрушения клеток сопровождают ряд заболеваний нервной системы [24], в том числе и ишемию головного мозга, эпилепсию [21].

В работе [25] на переживающих срезах головного мозга крыс в модели гипоксии *in vitro* было показано, что салициловая и ацетилсалициловая кислоты снижают окислительный стресс и активность индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS). При этом салициловая кислота обладала более мощным антиоксидантным действием, поэтому был сделан вывод, что салициловая кислота как продукт распада играет важную роль в цитопротекторном эффекте в тканях головного мозга крыс после введения ацетилсалициловой кислоты.

Таким образом, на нейронах моллюсков и млекопитающих показано, салициловая и ацетилсалициловая кислоты обладают преимущественно угнетающими, тормозными нейротропными эффектами, механизм действия которых зависит от влияния на функционирование ионных, синаптических и сигнальных процессов, протекающих в нейронах моллюсков и млекопитающих.

Нейротропные эффекты солей ацетилсалициловой и салициловой кислот с щелочными металлами и металлами-комплексообразователями.

Важным направлением современной биоорганической и фармацевтической химии, биомедицины является создание новых лекарственных форм и средств на основе ацетилсалициловой кислоты, лишённых её отрицательных побочных эффектов [26, 27]. Ведущую роль в этом направлении играют новые производные ацетилсалициловой и салициловой кислот, которые были получены на основе их соединений и комплексов с различными биологически активными молекулами и металлами [26].

Известно, что салицилат натрия, имеющий в составе молекулы щелочной метал натрий, применяется в медицинской практике как анальгетик при хронической боли, в зависимости от используемой дозы блокирует либо ослабляет частоту импульсной активности термочувствительных нейронов преоптической и передней

областей гипоталамуса, вызванную пирогенами [28]. Существуют также сведения, что в мозге крыс он ослабляет тормозные постсинаптические токи пирамидных нейронов слуховой коры и селективно изменяет спонтанную импульсную активность нейронов медиального коленчатого тела [29], модулирует нейронную активность в первичной слуховой коре кошек [30]. На культуре нейронов задних рогов спинного мозга было обнаружено, что салицилат натрия при совместной аппликации с ГАМК обратимо ослабляет их ответ на возбуждение ГАМК-А рецепторов [31]. Есть сведения, что это вещество значительно повышало возбуждение нейронов CA1 области гиппокампа крыс за счет снижения ингибирующей ГАМК-ергической передачи [32]. Кроме того, салицилат натрия может активировать серотонинергические нейроны дорзального ядра шва и может повышать уровень серотонина в нижней части четверохолмия и в слуховой коре грызунов. В исследованиях нейронной активности и ГАМК-ергической тормозной передачи на переживающих срезах дорзального ядра шва крыс методом пэтч-кламп регистрации в парадигме «whole cell» показано [33], что гиперполяризация МП, вызванная салицилатом натрия, приводила к увеличению входного сопротивления и потенциал-вызванной пачечной активности ГАМК-ергических нейронов в отличие от серотонинергических нейронов. Кроме того, салицилат натрия уменьшал ГАМК-обусловленные спонтанные и миниатюрные тормозные постсинаптические токи серотонинергических нейронов.

Салицилаты кобальта и цинка, имеющие в составе молекул металлы-комплексобразователи, оказывают активационно-модулирующее действие на электрическую активность нейронов моллюска *Helix albescens* Rossm., увеличивая частоту их импульсации в концентрациях 10^{-3} и 10^{-2} моль/л (табл.) [5, 6, 8, 10–12]. Оказалось, что в концентрации 10^{-3} моль/л они инициируют импульсную активность у молчащих нейронов и изолированных клеток ППа1, вызывая у некоторых нейронов колебания МП и генерацию пачечного ритма. Было выяснено [5, 6, 8, 10–12], что салицилаты кобальта и цинка можно использовать в качестве экзогенных функциональных аналогов инициирующего фактора и механизм их влияния опосредуется через систему циклических нуклеотидов. Более подробно механизмы этих соединений в различных концентрациях представлены в табл.

Ацетилсалицилаты кобальта и цинка в концентрациях $5 \cdot 10^{-5}$, $5 \cdot 10^{-4}$ и $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л оказывают обратимое активационно-модулирующее влияние на параметры электрических потенциалов различных нейронов моллюска *Helix albescens* Rossm. (неидентифицированные нейроны правого парietального и висцерального ганглия, нейроны ППа1 и ППа2) моллюсков и вызывают появление импульсной активности у фоновонеактивных нервных клеток [9, 11–14, 34, 35]. При этом выяснено, что такие эффекты связаны с увеличением ($5 \cdot 10^{-5}$ и $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л) или снижением ($5 \cdot 10^{-3}$ моль/л) проницаемости плазматических мембран нейронов для Na^+ , а также снижением ($5 \cdot 10^{-5}$ моль/л) или увеличением ($5 \cdot 10^{-4}$ и $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л) проницаемости мембран для K^+ [9, 11–14, 34, 35], однако они не зависят от Ca^{2+} [9, 11–14]. Кроме того, салицилат кобальта, ацетилсалицилат кобальта, салицилат цинка и ацетилсалицилат цинка в концентрации 10^{-3} М облегчает трансинаптическую передачу между нейронами, а в концентрации 10^{-2} моль/л –

полностью и необратимо её блокирует [7, 8, 13]. Более подробно механизмы действия ацетилсалицилата кобальта и ацетилсалицилата цинка в различных концентрациях на нейроны моллюсков представлены в табл.

Подобный активационно-модулирующий эффект на импульсную активность нейронов улитки ацетилсалицилаты кобальта и цинка оказывали и в диапазоне сверхмалых концентраций [18], что выражалось в возникновении медленноволновой пачечной активности у нейронов моллюска *Helix albescens* Rossm. Активационный эффект ацетилсалицилата кобальта в концентрации 10^{-12} моль/л выражался в увеличении амплитуды, длительности ПД и скорости нарастания входящих ионных токов при небольшой гиперполяризации МП, а в концентрациях 10^{-14} и 10^{-17} моль/л наблюдалось увеличение частоты генерации импульсов. Ацетилсалицилат цинка в концентрациях 10^{-12} и 10^{-17} моль/л приводил к увеличению скорости входящих трансмембранных ионных токов, а в концентрации 10^{-14} моль/л были отмечены деполяризация МП, увеличение в три раза частоты генерации импульсов и уменьшение длительности ПД по сравнению с фоном. У фоновонеактивных нейронов висцерального ганглия ацетилсалицилат цинка в концентрации 10^{-14} моль/л вызывал возникновение импульсной активности, что характеризует его как инициирующий фактор электрической активности. При этом эффекты ацетилсалицилата кобальта были менее выражены по сравнению с эффектами ацетилсалицилата цинка.

Таким образом, существующие данные научных исследований позволяют говорить о том, что соли салицилатов, имеющие в составе молекул щелочные металлы и металлы-комплексобразователи, обладают качественно иными, новыми, и часто противоположными по сравнению с предшественниками нейротропными свойствами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На различных беспозвоночных и позвоночных животных доказано, что салицилаты и их производные с различными металлами обладают обширным спектром нейротропных эффектов на клеточном уровне организации живой материи. В их реализации задействованы ионные, синаптические и сигнальные механизмы управления функциональным состоянием клетки. Введение в состав молекул салицилатов различных щелочных металлов (натрий) и металлов-комплексобразователей (кобальт, цинк) существенно изменяет и модифицирует нейротропные свойства новых производных по сравнению с первоначальными компонентами-предшественниками.

Нейротропные свойства салицилатов обнаружены не только в обычных, но и даже в сверхмалых дозах. Это повышает интерес к изучению их эффектов на нервную систему, поскольку такие исследования могут послужить основой для создания новых лекарственных препаратов, обладающих низкой токсичностью и высокой безопасностью для пациентов, а также новых и безопасных оздоровительно-превентивных технологий, базирующихся на использовании феномена сверхмалых доз.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-33-70142 «Координационные соединения ацетилсалициловой кислоты: синтез, биоскрининг и целенаправленный поиск нейро- и психотропных свойств» в рамках научной деятельности Центра коллективного пользования научным оборудованием «Экспериментальная физиология и биофизика» Таврической академии (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского».

Список литературы

1. Антропов Ю. Ф. Психосоматические расстройства и патологические привычные действия у детей и подростков / Ю. Ф. Антропов, Ю. С. Шевченко. – М.: Ин-т психотерапии, 1999. – 297 с.
2. Вейн А. М. Болевые синдромы в неврологической практике / Вейн А. М. – М.: МЕД-пресс-информ, 2001. – 368 с.
3. Гилман А. Г. Клиническая фармакология / Гилман А. Г. – Т. 4. – М.: Практика, 2006. – 336 с.
4. Кореньюк И. И. Влияние салициловой кислоты и её солей на электрическую активность нейронов виноградной улитки / И. И. Кореньюк, Д. Р. Хусаинов, В. Ф. Шульгин // Нейрофизиология/Neurophysiology. – 2005. – Т. 37, № 2. – С. 142–150.
5. Korenyuk I. I. Cobalt and Zinc Salicylates as Functional Analogs of an Initiating Factor in the Molluscan Nervous System / I. I. Korenyuk, D. R. Khusainov, V. F. Shul'gin // Neurophysiology. – 2006. – Vol. 38, № 1. – P. 9–14.
6. Нейротропные эффекты химических соединений различных классов и возможные механизмы их действия / И. И. Кореньюк, Т. В. Гамма, Д. Р. Хусаинов и др. – Симферополь: ДИАИПИ, 2012. – 182 с.
7. Хусаинов Д. Р. Влияние ацетилсалициловой кислоты и её солей на синаптическую задержку в подглоточных ганглиях улитки / Д. Р. Хусаинов, И. В. Черетаев, О. В. Катюшина [и др.]. // Таврический медико-биологический вестник. – 2011. – Т. 14, № 4, Ч. 2. – С. 171–174.
8. Хусаинов Д. Р. Влияние налоксона, салициловой кислоты и её производных на электрическую активность и транссинаптические связи нейронов виноградной улитки / Хусаинов Д. Р. – Симферополь: ТНУ, 2005. – 129 с.
9. Черетаев И. В. Анализ АТФ-зависимых и кальциевых механизмов в реализации нейротропного действия аспирина и его производных / И. В. Черетаев, И. И. Кореньюк, Д. Р. Хусаинов // Успехи современного естествознания. – 2013. – № 4. – С. 64–69.
10. Черетаев И. В. Механизм действия салициловой кислоты и её солей на нейроны улитки / И. В. Черетаев, И. И. Кореньюк, Д. Р. Хусаинов [и др.]. // Нейрофизиология/Neurophysiology. – 2012. – Т. 44, № 2. – С. 178–181.
11. Черетаев И. В. Аденозинтрифосфат- и кальцийзависимые механизмы в нейротропных эффектах салицилатов / И. В. Черетаев, И. И. Кореньюк, В. Ф. Шульгин [и др.]. // Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2012. – Т. 25 (64), № 1. – С. 230–243.
12. Черетаев И. В. АТФ-зависимые и кальциевые механизмы влияния салицилатов на электрические потенциалы нейронов моллюска *Helix albescens* / И. В. Черетаев, И. И. Кореньюк, Д. Р. Хусаинов [и др.]. // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 2015. – Т. 101, № 3. – С. 326–336.
13. Черетаев И. В. Особенности электрических потенциалов нейронов *Helix albescens* Rossm. при действии эталонных и новосинтезированных салицилатов / Черетаев И. В. – Симферополь: ТНУ, 2012. – 142 с.
14. Cheretaev I. V. ATP-Dependent and Calcium Mechanisms of the Effects of Salicylates on Electrical Potentials in Neurons in the Mollusk *Helix Albescens* / I. V. Cheretaev, I. I. Korenyuk, D. R. Khusainov [et al.]. // Neuroscience and Behavioral Physiology. – 2016. – Vol. 46, No. 6. – P. 644–651.
15. Черетаев И. В. Характеристика и механизмы импульсной активности нейронов виноградной улитки / И. В. Черетаев, Д. Р. Хусаинов, И. И. Кореньюк [и др.]. // Ученые записки Таврического

- национального университета им. В. И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2009. – Т. 22 (61), № 4. – С. 202–215.
16. Сафонова Т. А. Кардиореспираторная система моллюсков: структура, функции, механизмы регуляции / Т. А. Сафонова, В. Л. Журавлёв, А. Д. Ноздрачёв – СПб.: Изд-во С.-Петербург. ун-та, 2008. – 244 с.
 17. Черетаев И. В. Влияние неопиоидного анальгетика «Аспирин» на ГАМК-обусловленную сетевую активность нейронов гиппокампа новорождённых крысят / Черетаев И. В., Хусаинов Д. Р., Яковлев А. В. [и др.]. // Космос и биосфера : тез. докл. XII Международной крымской конференции. – Симферополь : ИТ «АРИАЛ», 2017. – С. 205–209.
 18. Черетаев И. В. Влияние аспирина на ГАМК-обусловленную сетевую активность нейронов гиппокампа крысят / И. В. Черетаев, Д. Р. Хусаинов // X Всероссийский конгресс молодых ученых-биологов «Симбиоз – 2017». Сборник тезисов. (Казань, 25–28 октября 2017 г.) / под общ. ред. Т. В. Балтиной, Г. Г. Яфаровой. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2017. – С. 267–269.
 19. Катюшина О. В. Влияние сверхнизких концентраций ацетилсалициловой кислоты и ее солей на электрическую активность нейронов виноградной улитки / О. В. Катюшина, Д. Р. Хусаинов, И. И. Коренюк [и др.]. // Тез. докл. научно-практ. конф. «Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения» 2011 г. 23-28 мая, Новый свет, Крым. – Киев: Издатель В. С. Мартынюк, 2011. – С. 338.
 20. Дзяк Л. А. Эпилепсия / Дзяк Л. А., Зенков Л. Р., Кириченко А. Г. – К.: Книга-плюс, 2001. – 168 с.
 21. Choi J. Role of brain inflammation in epileptogenesis / J. Choi, S. Koh // Yonsei Med. J. – 2008. – Vol. 49, № 1. – P. 1–18.
 22. Kumaria A. ATP signalling in epilepsy / A. Kumaria, C. M. Tolia, G. Burnstock // Purinergic Signalling. – 2008. – Vol. 4, № 4. – P. 339–346.
 23. Венгеровский А. И. Лекции по фармакологии / Венгеровский А. И. . – Томск: СибГМУ, 2007. – 390 с.
 24. Беспрозванный И. Б. Система кальциевой сигнализации при нейродегенерации / И. Б. Беспрозванный // Acta Naturae. – 2010. – Т. 2, № 1. – С. 80–88.
 25. De La Cruz J. P. Antioxidant Effect of Acetylsalicylic and Salicylic Acid in Rat Brain Slices Subjected to Hypoxia / De La Cruz J. P., Guerrero A., Gonzalez-Correa J. A. [et al.] // Journal of Neuroscience Research. – 2004. – Vol. 75, № 2. – P. 280–290.
 26. Григорьева А. С. Оптимизация фармакотерапевтической активности биометаллов при комплексообразовании с НПВП / Григорьева А. С. // Микроэлементы в медицине. – 2000. – № 1. – С. 17–22.
 27. Bica K. In search of pure liquid salt forms of aspirin: ionic liquid approaches with acetylsalicylic acid and salicylic acid / K. Bica, C. Rijkssen, M. Nieuwenhuyzen [et al.]. // Phys. Chem. Chem. Phys. – 2010. – Vol. 12. – P. 2011–2017.
 28. Nakashima T. Effects of endotoxin and sodium salicylate on the preoptic thermosensitive neurons in tissue slices / T. Nakashima, T. Hori, T. Kiyohara [et al.]. // Brain Res. Bull. – 1985. – Vol. 15, № 5. – P. 459–463.
 29. Wang J. Effects of sodium salicylate on spontaneous activity in the medial geniculate body / J. Wang, Y. Yu, Q. Xia // FASEB J. – 2006. – Vol. 20, № 3 A. – P. 690.
 30. Zhang X. Salicylate induced neural changes in the primary auditory cortex of awake cats / X. Zhang, P. Yang, Y. Cao [et al.]. // Neurosci. – 2011. – Vol. 172, № 1. – P. 232–245.
 31. Xu H. Sodium salicylate reduces gamma aminobutyric acid-induced current in rat spinal dorsal horn neurons / H. Xu, N. Gong, L. Chen [et al.]. // Neuroreport. – 2005. – Vol. 16, № 8. – P. 813–816.
 32. Gong N. The aspirin metabolite salicylate enhances neuronal excitation in rat hippocampal CA1 area through reducing GABAergic inhibition / N. Gong, M. Zhang, X. Zhang [et al.]. // Neuropharmacology. – 2008. – Vol. 54, № 2. – P. 454–463.
 33. Jin Y. Sodium Salicylate Suppresses GABAergic Inhibitory Activity in Neurons of Rodent Dorsal Raphe Nucleus / Jin Y., Luo B., Su Y.-Y. [et al.]. // PLoS ONE. – 2015. – Vol. 10, № 5. – P. e0126956.
 34. Черетаев И. В. Влияние ацетилсалицилата кобальта на электрическую активность нейронов ППа1 и ППа2 моллюска *Helix albescens* Rossm. / И. В. Черетаев, Д. Р. Хусаинов, И. И. Коренюк // Молодой учёный. – 2015. – № 4 (84). – С. 69–73.

35. Черетаев И. В. Влияние ацетилсалицилата цинка на электрическую активность нейронов улитки / И. В. Черетаев, И. И. Кореньюк, Д. Р. Хусаинов [и др.]. // Геополитика и экодинамика регионов. – 2013. – Т. 9, № 2 (2). – С. 99–108.

NEUROTROPIC EFFECTS OF SALICYLATES: PHYSIOLOGICAL MECHANISMS

Cheretaev I. V., Khusainov D. R., Koreniuk I. I., Chuyan E. N., Ravaeva M. Yu., Shulgin V. F., Gusev A. N.

*V. I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Crimea, Russia
E-mail: cheretaev86@yandex.ru*

A common problem people have in modern society are pathology related to the functioning of the various elements of the nervous system, pain syndromes, and anxiety and depressive disorders, which predetermines the necessity of finding new effective neurotropic substances, the study of their mechanism of action.

Candidates for the role of these relatively safe assets compared with the traditional anxiolytics, antidepressants, and opioid analgesics can be representatives of non-narcotic analgesics – salicylates. Recent information about neurotropic effects of salicylates and their physiological mechanisms have increased considerably.

The purpose of this review is to summarize current literature data and the results of their research on neurotropic effects of salicylates and physiological mechanisms underlying them.

A number of studies have shown that salicylic and acetylsalicylic acid significantly alter the electrical potentials of neurons Rpa1 and Rpa2, as well as unidentified cells in the visceral and right parietal ganglia of the grape snail *Helix albenscens Rossm.* Arguing in favor of the fact that these effects of salicylic and acetylsalicylic acids due to impaired functioning of the channels facing the incoming chlorine and potassium current, inhibition of the biosynthesis of ATP. Not ruled out blocking the action of these acids on the calcium channels of the incoming current. Clear that salicylic and acetylsalicylic acid slow synaptic transmission in the central nervous system grape snails.

An important direction in the modern bioorganic and pharmaceutical chemistry, biomedicine is the creation of new formulations and products based on acetylsalicylic acid, deprived of its negative side effects. A leading role in this direction is played by new derivatives of acetylsalicylic and salicylic acids, obtained on the basis of their complexes with various biologically active molecules and metals, e.g., sodium salicylate, cobalt salicylate, zinc salicylate, cobalt acetylsalicylate, zinc acetylsalicylate.

Salicylates cobalt and zinc have the activation-modulation effect on the electrical activity of mollusk neurons, increasing the frequency of pulsation in concentrations of 10^{-3} and 10^{-2} mol/L. In a concentration of 10^{-3} mol/L, they initiate the switching activity in silent neurons and isolated cells Rpa1, causing some neurons, oscillations of membrane potential and the generation of the burst rate. Salicylates cobalt and zinc can be used as functional analogues of exogenous triggering factors and the mechanism of their influence is mediated through the system of cyclic nucleotides.

Acetylsalicylate of cobalt and zinc in concentrations of $5 \cdot 10^{-5}$, $5 \cdot 10^{-4}$ and $5 \cdot 10^{-3}$ mol/L have a reversible activation-modulating effect on the parameters of electrical potentials of different neurons (unidentified neurons, neurons Rpa1 and Rpa2) shellfish and cause the appearance of impulse activity in inactive nerve cells.

On various invertebrates and vertebrates, it has been proved that salicylates and their derivatives with various metals have an extensive spectrum of neurotropic effects at the cellular level of organization of living matter. In their implementation, ionic, synaptic and signal mechanisms of controlling the functional state of the cell are involved. The introduction of metal-complexing agents into the composition of salicylate molecules substantially changes and modifies the neurotropic properties of the new derivatives in comparison with the original precursor components.

The neurotropic properties of salicylates are found not only in ordinary, but even in ultra-low doses. This increases interest in studying their effects on the nervous system, since such studies can serve as the basis for the creation of new drugs with low toxicity and high safety for patients, as well as new and safe health-improving and preventive technologies based on the use of the phenomenon of ultra-low doses.

Keywords: neurotropic effects, salicylates, physiological mechanisms.

References

1. Antropov Yu. F., Shevchenko Yu. S., *Psihosomaticheskie rasstrojstva i patologicheskie privychnye dejstviya u detej i podrostkov*, 297 p. (Institut psihoterapii, Moscow, 1999).
2. Vejn A. M., *Pain syndromes in neurological practice*, 368 p. (MED-press-inform, Moscow, 2001).
3. Gilman A. G., *Clinical Pharmacology*, 336 p. (Praktika, Moscow, 2006).
4. Korenyuk I. I., Husainov D. R., Shul'gin V. F., The effect of salicylic acid and its salts on the electrical activity of grape snail neurons, *Nejrofiziologiya/Neurophysiology*, **37**, **2**, 142 (2005).
5. Korenyuk I. I., Khusainov D. R., Shul'gin V. F. Cobalt and Zinc Salicylates as Functional Analogs of an Initiating Factor in the Molluscan Nervous System, *Neurophysiology*, **38**, **1**, 9 (2006).
6. Korenyuk I. I., Gamma T. V., Husainov D. R., Ravaeva M. Yu., Kizilov A. E., Kostyuchenko O. V., Kolotilova O. I. *Neurotropic effects of chemical compounds of different classes and possible mechanisms of their action*, 182 p. (Simferopol, DIAJPI, 2012).
7. Husainov D. R., Cheretaev I. V., Katyushina O. V., Korenyuk I. I., Gamma T. V., Kolotilova O. I. The effect of acetylsalicylic acid and its salts on synaptic retention in the subpharyngeal ganglia of a snail, *Tavricheskij mediko-biologicheskij vestnik*, **14**, **4** (2) 171 (2011).
8. Husainov D. R., *Effect of naloxone, salicylic acid and its derivatives on electrical activity and transsynaptic connections of neurons of grape snail*, 129 p. (Simferopol, TNU, 2005).
9. Cheretaev I. V., Korenyuk I. I., Husainov D. R., Analysis of ATP-dependent and calcium mechanisms in the neurotropic effect of aspirin and its derivatives, *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya*, **4**, 64 (2013).
10. Cheretaev I. V., Korenyuk I. I., Husainov D. R., Katyushina O. V., Gamma T. V., Kolotilova O. I., Mechanisms Underlying the Effects of Salicylic Acid and Its Salts on Helix Neurons, *Nejrofiziologiya/Neurophysiology*, **44**, **2**, 178 (2012).
11. Cheretaev I. V., Korenyuk I. I., Shul'gin V. F., Husainov D. R., Katyushina O. V., Gamma T. V., Kolotilova O. I., Adenosinetriphosphate- and calciumdependence mechanisms of salicylate neurotropic effects, *Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University. Series: Biology, chemistry.*, **25**, (64), **1**, 230 (2012).
12. Cheretaev I. V., Korenyuk I. I., Husainov D. R., Gamma T. V., Kolotilova O. I., Nozdrachyov A. D. ATP- and calcium-dependent mechanisms of salicylates influence on electric potentials of neurons in mollusk *Helix albescens*, *Rossijskij fiziologicheskij zhurnal im. I.M. Sechenova*, **101**, **3**, 326 (2015).
13. Cheretaev I. V., *Features of electric potentials of Helix albescens Rossm. molluscs neurons at the action of standard and newly synthesized salicylates*, 142 p. (Simferopol, TNU, 2012).

14. Cheretaev I. V., Korenyuk I. I., Khusainov D. R., Gamma T. V., Kolotilova O. I., Nozdrachev A. D. ATP-Dependent and Calcium Mechanisms of the Effects of Salicylates on Electrical Potentials in Neurons in the Mollusk *Helix Albescens*, *Neuroscience and Behavioral Physiology*, **46**, 6, 644 (2016).
15. Cheretaev I. V., Husainov D. R., Korenyuk I. I., Gamma T. V., Characteristic and mechanisms of impulsive activity of neurons of snail, *Scientific Notes of Taurida V. I. Vernadsky National University. Series: Biology, chemistry.*, **22 (61)**, 4, 202 (2009).
16. Safonova T. A., Zhuravlyov V. L., Nozdrachyov A. D., *Cardio-respiratory system of mollusks: structure, functions, mechanisms of regulation*, 244 p. (SPb., Izdatel'stvo Sankt-Peterburgskogo universiteta, 2008).
17. Cheretaev I. V., Husainov D. R., Yakovlev A. V., Sitdikova G. F., Korenyuk I. I., The Influence of Non-opioid Analgesic «Aspirin» on GABA-mediated Network Activity of Hippocampal Neurons of Newborn, «*Kosmos i biosfera*» tez. dokl. XII Mezhdunarodnoj krymskoj konferencii, 205–209 pp. (Simferopol, IT «ARIAL», 2017).
18. Cheretaev I. V., Husainov D. R. Influence of Aspirin on GABA-deprived network activity of hippocampal neurons of newborn rats, *X Vserossijskij kongress molodyh uchenyh-biologov «Simbioz – 2017»*, 267–269 pp. (Kazan': Izdatel'stvo Kazanskogo universiteta, 2017).
19. Katyushina O. V., Husainov D. R., Korenyuk I. I., Gamma T. V., Cheretaev I. V., Kolotilova O. I., The influence of ultralow concentrations of acetylsalicylic acid and its salts on the electrical activity of the neurons of grape snail, Scientific Conference «Biologically Active Substances: Fundamental and Applied Problems», Novy Svet, AR Crimea, Ukraine, May 23–28, 2011, p. 338 (Kiev: Izdatel' V.S. Martynyuk, 2011).
20. Dzyak L. A., Zenkov L. R., Kirichenko A. G., *Epilepsy*, 168 p., (Kiev, Kniga-plyus, 2001).
21. Choi J., Koh S., Role of brain inflammation in epileptogenesis, *Yonsei Med. J.*, **49**, 1, 1 (2008).
22. Kumaria A., Tolias C. M., Burnstock G., ATP signalling in epilepsy, *Purinergic Signalling*, **4**, 4, 339 (2008).
23. Vengerovskij A. I., *Lectures on Pharmacology*, 390 p. (Tomsk: SibGMU, 2007).
24. Besprozvannyj I. B., System of calcium signaling during neurodegeneration, *Acta Naturae*, **2**, 1, 80 (2010).
25. De La Cruz, J. P., Guerrero A., Gonzalez-Correa J. A., Arrebola M. M., de la Cuesta F. S. Antioxidant Effect of Acetylsalicylic and Salicylic Acid in Rat Brain Slices Subjected to Hypoxia, *Journal of Neuroscience Research*, **75**, 280 (2004).
26. Grigor'eva A. S., Optimization of pharmacotherapeutic activity of biomaterials with complexation with NSAIDs, *Mikroelementy v medicine*, **1**, 17 (2000).
27. Bica K., Rijkse C., Nieuwenhuyzen M., Rogers R. D., In search of pure liquid salt forms of aspirin: ionic liquid approaches with acetylsalicylic acid and salicylic acid, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **12**, 2011 (2010).
28. Nakashima T., Hori T., Kiyohara T., Shibata M., Effects of endotoxin and sodium salicylate on the preoptic thermosensitive neurons in tissue slices, *Brain Res. Bull.*, **15**, 5, 459 (1985).
29. Wang J., Yu Y., Xia Q., Effects of sodium salicylate on spontaneous activity in the medial geniculate body, *FASEB J.*, **20**, 3 A, 690 (2006).
30. Zhang X., Yang P., Cao Y., Qin L., Sato Y., Salicylate induced neural changes in the primary auditory cortex of awake cats, *Neurosci.*, **172**, 1, 232 (2011).
31. Xu H., Gong N., Chen L., Xu T.-L., Sodium salicylate reduces gamma aminobutyric acid-induced current in rat spinal dorsal horn neurons, *Neuroreport*, **16**, 8, 813 (2005).
32. Gong N., Zhang M., Zhang X., Sun G. C., Xu T. L., The aspirin metabolite salicylate enhances neuronal excitation in rat hippocampal CA1 area through reducing GABAergic inhibition, *Neuropharmacology*, **54**, 2, 454 (2008).
33. Jin Y., Luo B., Su Y.-Y., Wang X.-X., Chen L., Wang M., Wang W.-W., Chen L. Sodium Salicylate Suppresses GABAergic Inhibitory Activity in Neurons of Rodent Dorsal Raphe Nucleus, *PLoS ONE*, **10**, 5, e0126956 (2015).
34. Cheretaev I. V., Husainov D. R., Korenyuk I. I., The effect of cobalt acetylsalicylate on the electrical activity of the Rpa1 and Rpa2 neurons of the mollusk *Helix albescens* Rossm., *Molodoj uchyonyj*, **4 (84)**, 69 (2015).
35. Cheretaev I. V., Korenyuk I. I., Husainov D. R., Katyushina O. V., Gamma T. V., Influence of acetylsalicylate zinc on electric activity of snail's neurons, *Geopolitika i ehkodinamika regionov*, **9**, 2 (2), 99 (2013).

УДК 159.922.7:612.821.014.421.7

ОПТИМИЗАЦИЯ ПСИХОФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ДЕТЕЙ С ЗАДЕРЖКОЙ ПСИХОРЕЧЕВОГО РАЗВИТИЯ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ОБРАТНОЙ СВЯЗИ ПО ПАРАМЕТРАМ ЭЭГ

Эйсмонт Е. В., Начарова М. А., Никифорова Е. В.

*Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», Симферополь, Республика Крым, Россия
E-mail: evgenija.eismont@mail.ru*

Проводилась оценка эффективности применения метода обратной связи по характеристикам ЭЭГ для нормализации эмоциональных и когнитивных показателей детей 4-8 лет с задержками психоречевого развития. Тренируемыми параметрами ЭЭГ являлись амплитуда сенсомоторного ритма и отношение амплитуд сенсомоторного и тета-ритмов в локусе С4. После проведения тренингов наблюдалось увеличение тренируемых параметров ЭЭГ, невербального и общего интеллекта, снижение показателей по шкале «трудности общения». Результаты свидетельствуют о целесообразности применения метода обратной связи по ЭЭГ для оптимизации когнитивных функций и эмоционального состояния детей с задержками психоречевого развития.

Ключевые слова: ЭЭГ, дети, ЭЭГ-БОС, задержки психоречевого развития.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время число детей, имеющих нарушения речи, растет и составляет 25 % дошкольников и детей младшего школьного возраста [1]. Чаще всего нарушения речевого развития коррелируют с задержками психического развития, в связи с чем детям ставят диагноз задержки психоречевого развития (ЗПРР) [2]. Признаками ЗПРР являются отставание в развитии основных психофизических функций (моторики, речи, социального поведения), эмоциональная незрелость, нарушения внимания и, в большинстве случаев, повышенная тревожность [3, 4]. Одним из методов коррекции перечисленных нарушений является метод биологической обратной связи по ЭЭГ (ЭЭГ-БОС). Так, была показана высокая эффективность метода ЭЭГ-БОС в коррекции эмоционального состояния [5], синдрома дефицита внимания и гиперактивности [6], в снижении повышенной тревожности [7], коррекции расстройств аутистического спектра [8], а также для улучшения процессов восприятия [9], снижения уровня психоэмоционального напряжения и утомления [10]. Особенно ценным в работе с детьми является неинвазивность и отсутствие неблагоприятных эффектов метода. При этом неизученным остается вопрос о возможности применения данного метода и его эффективности в оптимизации эмоционального состояния и улучшении когнитивных функций детей с ЗПРР.

Целью настоящего исследования являлось установление эффективности метода ЭЭГ-БОС в оптимизации эмоционального состояния и когнитивных функций детей 4–8 лет с задержками психоречевого развития.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие 7 детей в возрасте 4–8 лет с задержками психоречевого развития (6 мальчиков и 1 девочка). Регистрация и анализ ЭЭГ осуществлялись с помощью компьютерного телеметрического электроэнцефалографа «Тредекс» в диапазоне частот от 1,5 до 35 Гц. Частота оцифровки ЭЭГ-сигналов составляла 250 Гц. ЭЭГ-потенциалы отводили монополярно от локусов Fp1, Fp2, F3, F4, F7, F8, C3, C4, T3, T4, T5, T6, P3, P4, O1 и O2 в соответствии с международной системой «10-20». В качестве референтного электрода в каждом случае использовали все электроды, кроме активного, объединенные вместе. Нейтральный («заземляющий») электрод располагали в локусе Fz. Обработка сигналов производилась с помощью быстрых преобразований Фурье с последующим сглаживанием по методу Баттерворта.

Тренинги состояли из 10 сеансов ЭЭГ-БОС, которые проводились два-три раза в неделю. Во время сеанса ребенок сидел на удобном стуле перед столом, на котором были установлены монитор и аудио колонки. Визуальные сигналы обратной связи предъявлялись с экрана монитора, звуковые – подавались через колонки. Перед тренингом ребенку в максимально доступной форме объясняли зависимость параметров сигналов обратной связи от психологического состояния. Тренинги были направлены на увеличение амплитуды сенсомоторного ритма в частотном диапазоне 8–13 Гц и снижение амплитуды тета-ритма в частотном диапазоне 4–7 Гц. Во всех протоколах сигнал обратной связи изменялся в зависимости от характеристик тренируемых ритмов в локусе C4. Каждый сеанс длился 20–30 минут и включал в себя применение следующих протоколов, чередующихся в случайном порядке:

1. Регуляция громкости «белого шума» – громкость «белого шума» изменялась обратно пропорционально значению отношения амплитуд сенсомоторного и тета-ритмов: чем больше было данное отношение, тем меньшую громкость имел «белый шум».

2. Регуляция громкости «белого шума» на фоне музыки – громкость «белого шума» изменялась обратно пропорционально значению отношения амплитуд сенсомоторного и тета-ритмов на фоне музыки фиксированной громкости.

3. Регуляция громкости музыки – громкость музыки изменялась прямо пропорционально значению отношения амплитуд сенсомоторного и тета-ритмов; чем больше было данное отношение, тем громче звучала музыка.

4. Регуляция яркости изображений – яркость отдельных элементов изображений (например, плодов на дереве, солнца, цветов) изменялась прямо пропорционально значению амплитуды сенсомоторного ритма.

5. Игровой протокол – скорость движения главного игрового персонажа изменялась прямо пропорционально величине отношения амплитуд сенсомоторного и тета-ритмов.

6. Видеопротокол с использованием мультфильма – яркость изображения и громкость звука мультфильма изменялись прямо пропорционально значению отношения амплитуд сенсомоторного и тета-ритмов.

Разнообразие протоколов, предположительно, способствовало более длительному поддержанию заинтересованности и требуемого уровня мотивации у детей 4-8 лет.

До и после каждого сеанса у детей регистрировали ЭЭГ при закрытых и открытых глазах в состоянии двигательного покоя. При исследовании эффективности сеансов ЭЭГ-БОС рассчитывали амплитуду (мкВ) тета-ритма (4–7 Гц), альфа-ритма (8–13 Гц; активность в данном частотном диапазоне, регистрируемая в отведениях С3 и С4, именуется сенсомоторным ритмом), а также величину отношения амплитуд альфа- и тета-ритмов. Данные электрофизиологического исследования обрабатывались с помощью стандартных методов вариационной статистики.

Для оценки интеллектуального развития использовался тест Векслера (WPPSI – для детей 4–5 лет, WISC – для детей от 5 лет), состоящий из 10 субтестов [11]. Оценивались показатели вербального, невербального и общего интеллекта. С помощью проективной методики «Дом-Дерево-Человек» [12] оценивались такие показатели как незащищенность, тревожность, недоверие к себе, чувство неполноценности, враждебность, фрустрация, трудности общения, депрессивность. Для определения достоверности различий в значениях психологических показателей до и после тренингов использовали t-критерий Стьюдента. Для определения достоверности различий исходных и итоговых значений спектральных характеристик ЭЭГ применяли ранговый критерий Вилкоксона.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Во время прохождения тренингов у детей с ЗППР наблюдались положительные изменения тренируемых параметров ЭЭГ. Так, амплитуда альфа-ритма ЭЭГ, регистрируемая при закрытых и открытых глазах перед началом каждого сеанса, возрастала от сеанса к сеансу. Результаты статистического анализа показали, что величина амплитуды альфа-ритма в состоянии спокойного бодрствования с открытыми глазами перед началом десятого сеанса была выше, чем перед началом первого сеанса, практически во всех локусах ЭЭГ (рис. 1), причем в отведении С4 эти различия достигали уровня статистической значимости ($p < 0,05$). Амплитуда альфа-ритма в данном отведении увеличилась на 18,7 %.

Известно, что более высоким показателям внимания и благоприятному состоянию эмоциональной сферы соответствуют большие значения амплитуд альфа-ритма и отношений амплитуд альфа- и тета-ритмов [13–15], в связи с чем зарегистрированные изменения можно рассматривать как положительные.

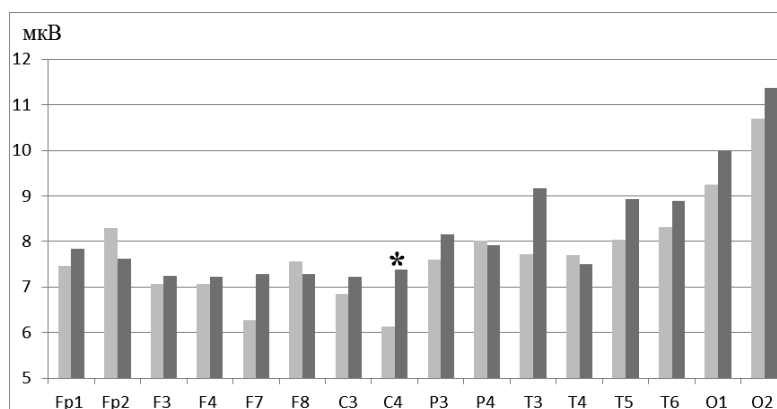


Рис. 1. Значения амплитуды альфа-ритма ЭЭГ во время спокойного бодрствования с открытыми глазами в группе детей перед началом проведения первого (светлые столбцы) и десятого (темные столбцы) сеансов. По горизонтали – локусы отведения ЭЭГ; по вертикали – амплитуда, мкВ. Звездочкой обозначены значимые различия ($p < 0,05$).

Положительные изменения также наблюдались во всех показателях интеллекта, оцениваемых с помощью теста Векслера (рис. 2), при этом изменения показателей невербального интеллекта и общего интеллекта достигали уровня статистической значимости ($p < 0,05$) (увеличение средних значений в группе детей с 75,6 до 83,8 баллов и с 60,6 до 66,0 баллов соответственно, $p < 0,05$). Улучшения показателей вербального интеллекта не достигали уровня статистической значимости, что может свидетельствовать о большем влиянии тренингов ЭЭГ-БОС на опосредованно связанные с речевым развитием показатели внимания и навыков самоконтроля.

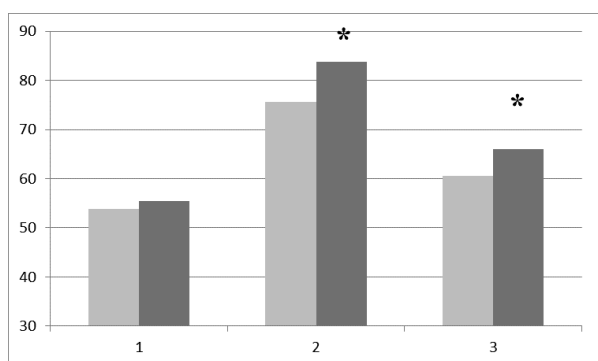


Рис. 2. Числовые показатели вербального, невербального и общего интеллекта по тесту Векслера, проводимого у детей с задержками психоречевого развития до (светлые столбцы) и после (темные столбцы) тренингов ЭЭГ-БОС. По горизонтали: 1 – вербальный интеллект, 2 – невербальный интеллект, 3 – общий интеллект; по вертикали – числовые показатели.

После прохождения тренинга у детей снизились практически все показатели по проективной методике «Дом–Дерево–Человек», отражающие психоэмоциональные проблемы, а снижение по шкале «Трудности общения» достигало уровня статистической значимости (3,33 и 1,83 баллов, соответственно до и после тренинга, $p < 0,05$). Снижение значений по шкале «Депрессивность» имело характер статистической тенденции ($p = 0,057$). Стоит отметить, что именно у детей с ЗПРР произошло значимое снижение показателей по шкале «трудности общения», тогда как у нормально развивающихся детей, участвующих в нашем предыдущем исследовании, таких изменений выявлено не было [16].

Полученные в результате настоящего исследования положительные изменения электроэнцефалографических и психологических показателей свидетельствуют об эффективности метода ЭЭГ-БОС в развитии когнитивных функций и оптимизации эмоционального состояния у детей 4–8 лет с задержками психоречевого развития.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

После прохождения тренингов ЭЭГ-БОС у детей 4–8 лет с ЗПРР наблюдалось увеличение амплитуды альфа-ритма в центральном отведении правого полушария ($p < 0,05$), а также положительные изменения психологических показателей, характеризующих состояние когнитивной и эмоциональной сфер: увеличение уровней общего и невербального интеллекта ($p < 0,05$) и снижение значений по шкале «трудности общения» ($p < 0,05$). Таким образом, настоящее исследование продемонстрировало возможность успешного применения метода обратной связи по характеристикам ЭЭГ для улучшения когнитивных показателей и оптимизации эмоционального состояния и у детей с задержками психоречевого развития.

Исследование выполнено в рамках поддержанного федеральным государственным автономным образовательным учреждением высшего образования «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского» гранта № ВГ12/2018».

Работа выполнена на оборудовании ЦКП научным оборудованием «Экспериментальная физиология и биофизика» ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского».

Список литературы

1. Степаненко Д. Г. О классификациях нарушения речи в детском возрасте / Д. Г. Степаненко, Э. Ш. Сагутдинова // Клиническая медицина. – 2010. – № 2. – С. 32–43.
2. Djalairova A. Sh. Primary diagnosis of the psychological and speech delay in children of 2–5 years / A. Sh. Djalairova, N. E. Likhacheva, M. M. Lepesova // Herald of Almaty State Institute of Advanced Medical Education. – 2018. – № 1. – С. 6–10.
3. Чутко Л. С. Задержки психического развития: клинико-электроэнцефалографические особенности и оценка эффективности применения препарата гопантеновой кислоты / Л. С. Чутко, С. Ю. Сурушкина, Е. А. Яковенко, И. С. Никишена, Т. И. Анисимова, Ю. Л. Бондарчук, А. В. Сергеев, Л. В. Аносова // Педиатрия. Приложение к журналу Consilium Medicum. – 2014. – № 3. – С. 38–42.

4. Чутко Л. С. Последствия специфических расстройств речевого развития у детей / Л. С. Чутко, С. Ю. Сурушкина, Е. А. Яковенко, А. В. Сергеев, А. В. Рожкова // Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. – 2018. – Т. 118, № 5. – С. 54–57.
5. Джунусова Г. С. Использование адаптивного биоуправления по ЭЭГ для коррекции функционального состояния неврологических больных / Г. С. Джунусова, Г. С. Курмашев // Физиология человека. – 2001. – Т. 28, № 1. – С. 18–22.
6. Gevensleben H. Neurofeedback training in children with ADHD: 6-month follow-up of a randomized controlled trial / H. Gevensleben, B. Holl, B. Albrecht // Eur. Child. Adolesc. Psychiatry. – 2010. – Vol. 19, No. 9. – P. 715–724.
7. Hammond D. Neurofeedback with anxiety and affective disorders. Child Adolesc. / Hammond D. // Psychiatric Clin. N. Am. – 2005. – Vol. 1, No. 5. – P. 105–123.
8. Zivoder I. Neurofeedback application in the treatment of autistic spectrum disorders (ASD) / I. Zivoder, S. Martic-Biocina, A. V. Kasic, J. Bosak // Psychiatr Danub. – 2015. – Vol. 27. – P. 391–4.
9. Salari N. Neurofeedback training of gamma band oscillations improves perceptual processing / N. Salari, C. Büchel, M. Rose // Experimental Brain Research. – 2014. – Vol. 232, No. 10. – P. 3353–3361.
10. Yakovlev N. M. A strategy of correction of adolescent deviant behavior based on adaptive self-regulation / N. M. Yakovlev, K. V. Konstantinov, V. M. Klimenko, Z. V. Kositskaya // Human Physiology. – 2007. – Т. 33, № 2. – С. 163–167.
11. Ильина М. Н. Психологическая оценка интеллекта у детей / М. Н. Ильина. – П.: Питер, 2006. – 368 с.
12. Семенова З. Ф. Психологические рисуночные тесты. Методика «Дом–Дерево–Человек» / З. Ф. Семенова, С. В. Семенова. – М.: АСТ; СПб.: Сова, 2007. – 190 с.
13. Эйсмонт Е. В. ЭЭГ-корреляты различных видов тревожности у подростков 14–15 лет / Е. В. Эйсмонт, Т. А. Алиева, Н. В. Луцук, В. Б. Павленко // Neurophysiology. – 2008. – Т. 40, № 5/6. – С. 448–456.
14. Phneah S. W. EEG-based alpha neurofeedback training for mood enhancement / S. W. Phneah, H. Nisar // Australasian Physical & Engineering Sciences in Medicine. – 2017. – Vol. 40, No. 2. – P. 325–336.
15. Raymond J. The effects of alpha/theta neurofeedback on personality and mood / J. Raymond, C. Varney, L. A. Parkinson, J. H. Gruzelier // Cognitive Brain Research. – 2005. – Vol. 23, No. 2-3. – P. 287–292.
16. Эйсмонт Е. В. Оптимизация когнитивных функций и эмоционального состояния детей 5–9 лет с помощью метода обратной связи по параметрам ЭЭГ / Е. В. Эйсмонт, М. А. Начарова, Е. В. Никифорова // Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского. Биология. Химия. – 2019. – Т. 5 (71), № 2. – С. 195–201.

OPTIMIZATION OF PSYCHOPHYSIOLOGICAL STATE OF CHILDREN WITH DELAYED SPEECH DEVELOPMENT USING EEG BIOFEEDBACK

Eismont E. V., Nacharova M. A., Nikiforova E. V.

*V. I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Crimea, Russia
E-mail: evgenija.eismont@mail.ru*

The efficiency of neurofeedback therapy for normalization of the cognitive functions and emotional state of children with speech delays have been conducted. Seven children with speech delays aged 4–8 years took part in the study. EEG registration and analysis was carried out using a computer telemetric electroencephalograph "Tredex" in the frequency range from 1.5 to 35 Hz. The frequency of digitization of the EEG signals was 250 Hz. EEG potentials were unipolarly removed from the loci Fp1, Fp2, F3, F4, F7, F8, C3, C4, T3, T4, T5, T6, P3, P4, O1 and O2 in accordance with the international system

“10-20”. All electrodes, except the active one, combined together were used as a reference electrode. A neutral (“grounding”) electrode was located at the Fz locus. Signal processing was performed using fast Fourier transforms, followed by Butterworth smoothing.

The trainings consisted of 10 neurofeedback sessions, which were performed two or three times per week. Each 20–30 minutes session consisted of random sequence of following neurofeedback protocols: white noise volume regulation; white noise volume regulation with music background; music volume regulation; image intensity regulation; game character speed regulation; cartoon video protocol. A variety of protocols, presumably, facilitated longer maintenance of interest and the higher level of motivation of 4–8 year children. In all protocols, the change of feedback signal depended on the characteristics of the trained rhythms in the locus C4. Trained parameters of EEG were the amplitude of sensorimotor rhythm and the ratio of the sensorimotor and theta-rhythms amplitudes.

To assess the level of intellectual development, the Wexler test consisting of 10 subtests was used. Indicators of verbal, non-verbal and general intelligence were measured. Levels of insecurity, anxiety, self-distrust, feelings of inferiority, hostility, frustration, communication difficulties and depression were evaluated using the projective methodology “House–Tree–Man”.

To determine the significance of differences in the values of psychological indicators before and after the trainings, Student t-test was used. To determine the significance of differences between the initial and final values of the EEG spectral characteristics the Wilcoxon rank test was used.

The results showed an increase of magnitude of trained EEG parameters after participation in neurofeedback sessions. Nonverbal and general intelligence are shown to increase in average from 75.6 to 83.8 and from 60.6 to 66.0, reaspectively. An increase in the amplitude of the alpha-rhythm was observed in the in the central lead of the right hemisphere (C4). The «comprehension difficulties» scale grades in the «House–Tree–Man» test also have been reduced after neurofeedback training completion in average from 3.33 to 1.83. The present study demonstrates the possibility of successful application of the EEG neurofeedback method when optimizing the emotional and cognitive state of children with speech delays.

Keywords: EEG, children, neurofeedback, speech delay.

References

1. Stepanenko D. G., Sagutdinova E. S. About speech/language disorders classifications in childhood, *Clinical medicine*, **2**, 32 (2010). Russian.
2. Djalairova A. Sh. Likhacheva N. E., Lepesova M. M. Primary diagnosis of the psychological and speech delay in children of 2–5 years, *Herald of Almaty State Institute of Advanced Medical Education*, **1**, 6 (2018).
3. Chutko L. S., Surushkina S. Yu., Yakovenko E. A., Nikishena I. S., Anisimova T. I., Bondarchuk Yu. L., Sergeev A. V., Anosova L. V. Zaderzhki psikhicheskogo razvitiya: kliniko-e`lektroe`nczefalograficheskie osobennosti i ocenka e`ffektivnosti primeneniya preparata gopantenovoj kisloty`, *Pediatrics. Prilozhenie k zhurnalu Consilium Medicum*, **3**, 38 (2014). Russian.
4. Chutko L. S., Surushkina S. Yu., Yakovenko E. A., Sergeev A. V., Rozhkova A. V. Consequences of specific language impairment in children, *Zh. Nevrol. Psikiatr. Im. S. S. Korsakova*, **5(118)**, 54 (2018). Russian.

5. Dzhunusova G. S., Kurmashev G. S. the Use of adaptive EEG biofeedback for the correction of the functional state of neurological patients, *Human Physiology*, **28(1)**, 18 (2001).
6. Gevensleben H., Holl B. Albrecht B. et al. Neurofeedback training in children with ADHD: 6-month follow-up of a randomized controlled trial, *Eur. Child. Adolesc. Psychiatry*, **19(9)**, 715 (2010).
7. Hammond D. Neurofeedback with anxiety and affective disorders. *Child Adolesc. Psychiatric Clin. N. Am.* **1(5)**, 105 (2005).
8. Zivoder I., Martic-Biocina S., Kosic A. V., Bosak J. Neurofeedback application in the treatment of autistic spectrum disorders (ASD), *Psychiatr Danub*, **27**, 391 (2015).
9. Salari N., Büchel C., Rose M. Neurofeedback training of gamma band oscillations improves perceptual processing, *Experimental Brain Research*, **232(10)**, 3353 (2014).
10. Yakovlev N. M., Konstantinov K. V., Klimenko V. M., Kositskaya Z. V. A strategy of correction of adolescent deviant behavior based on adaptive self-regulation, *Human Physiology*, **33(2)**, 163 (2007).
11. Ilina M. N. Psychological evaluation of intelligence in children, *Peter*, 368 (2006).
12. Semenova Z. F., Semenova S. V. *Psychological drawing tests. Method "House-Tree-Man"*, 190 (M.: ACT; SPb.: Owl, 2007) (Russian).
13. Eismont E. V., Aliyeva T. A., Lutsyuk N. V., Pavlenko V. B. EEG-correlates of different types of anxiety in adolescents 14–15 years, *Neurophysiology*, **40(5/6)**, 448 (2008).
14. Phneah S. W., Nisar H. EEG-based alpha neurofeedback training for mood enhancement, *Australasian Physical & Engineering Sciences in Medicine*, **40(2)**, 325 (2017).
15. Raymond J., Varney C., Parkinson L. A., Gruzelier J. H. The effects of alpha/theta neurofeedback on personality and mood, *Cognitive Brain Research*, **23(2-3)**, 287 (2005).
16. Eismont E. V., Nacharova M. A., Nikiforova E. V. Optimization of cognitive and emotional state of children aged 5–9 years using EEG neurofeedback, *Scientific Notes of V. I. Vernadsky Crimean Federal University. Biology. Chemistry*, **5(71)**, 195 (2019) (Russian).

УДК 633+546.23

**ЗАЩИТНО-СТИМУЛИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ НАНОСЕЛЕНА
В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СПОСОБА ПРЕДПОСЕВНОЙ ОБРАБОТКИ СЕМЯН
ПШЕНИЦЫ В УСЛОВИЯХ КОМБИНИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ
ЗАСОЛЕНИЯ И ЗАСУХИ**

Юркова И. Н., Омельченко А. В., Панов Д. А.

*Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный
университет имени В. И. Вернадского», Симферополь, Республика Крым, Россия
E-mail: nanosilver@rambler.ru*

Проведено исследование защитно-стимулирующего действия наноконпозиции селена на пшеницу в условиях комбинированного действия засоления и засухи, моделируемых NaCl и ПЭГ-6000. Впервые показано, что способ предпосевной обработки семян пшеницы наноселеном (замачивание или инкрустация) в условиях комбинированного действия засоления и засухи не оказывает значительного влияния на прирост сырой и сухой массы и стрессоустойчивость проростков пшеницы.
Ключевые слова: наноселен, засоление, засуха, пшеница, масса корней и листьев, обработка семян, пролин.

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время изменение климата приводит к дефициту пресной воды и увеличению засоления сельскохозяйственных земель. В связи с этим при выращивании большинства культурных растений, в том числе пшеницы, возникают многочисленные проблемы.

Совместное действие засоления и водного дефицита усиливает друг друга и вызывает опасный для растений окислительный стресс, нарушающий гомеостаз растительной клетки [1, 2]. Кроме того, это может привести к клеточному обезвоживанию и удалению воды из цитоплазмы [3]. Однако защитные механизмы, лежащие в основе адаптации растения к комбинированному действию засухи и засоления, остаются мало изучены. Действие как солевого, так и осмотического стрессов вызывают увеличение производства активных форм кислорода (АФК), таких как супероксид-радикал, перекись водорода и гидроксил-радикалы [4]. Каждое абиотическое стрессовое состояние, а тем более сочетание двух и более различных стрессов, требует индивидуальной реакции адаптации [5]. Для нейтрализации АФК в стрессовых условиях значительная роль принадлежит антиоксидантным ферментам пероксидазе (ПО), каталазе (КАТ), супероксиддисмутазе (СОД), аскорбатпероксидазе (АПО), глутатионредуктазе (ГР), а также неферментным антиоксидантам, таким как аскорбиновая кислота, глутатион

и др. [6]. Водный баланс при обезвоживании также поддерживается путем накопления клетками осмотически активных соединений.

Кроме того, баланс поглощения и потери воды при обезвоживании поддерживается путем накопления клетками осмотически активного пролина, стабилизирующего макромолекулы клеточных структур [7, 8].

Не менее важная роль в адаптации к стрессам принадлежит фитогормонам и селену [9–11]. Селен стимулирует не только физиолого-биохимическую активность растений, но и участвует в индукции стрессоустойчивости растений в условиях окислительного стресса, вызванного различными факторами [12–17]. Поэтому является очевидным, что действие селена на растения носит полифункциональный характер [18]. Наименее токсичными и биологически доступными являются наночастицы селена, обладающие пролонгированным действием. Однако биологическая активность селена зависит не только от его формы, но и способа обработки растений [19]. В отличие от внекорневой подкормки предпосевная обработка семян методом замачивания или инкрустации в композиции с биологически активными веществами является более эффективной. При инкрустации в качестве пленкообразователя в инкрустирующую смесь добавляют NaКМЦ, ПВС, полиакриамид и др. [20].

Целью работы было исследование защитно-стимулирующего влияния наноселена на проростки пшеницы в условиях комбинированного действия засоления и засухи в зависимости от метода предпосевной обработки семян.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования были семена озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Жнея и водорастворимая композиция наночастиц селена, полученная по оригинальной технологии, разработанной в Крымском федеральном университете им. В.И. Вернадского. Наноселен (Se^0) получали восстановлением селенистоокислого натрия (хч) L-цистеином («Synex Pharma», Китай) в присутствии стабилизатора альгината натрия (натриевая соль альгиновой кислоты, «Fluka») [21].

Для исследования протекторного действия наноселена в зависимости от способа обработки семян пшеницы в условиях комбинированного действия засоления и засухи в первом случае семена замачивали в течение 4 часов в растворе наноселена, во втором – обрабатывали способом инкрустации. Концентрация наноселена составляла 10,0; 20,0 и 30,0 мг/л. С целью инкрустации семян раствор наноселена смешивали с поверхностно-активным веществом «Липосам» (комплекс экзополимеров микроорганизмов) в концентрации 25,0 мг/л. Полученной смесью семена опрыскивали, а затем высушивали при комнатной температуре до полного высыхания. В первой серии контролем служили семена, замоченные в дистиллированной воде в течение 4 часов, во второй – семена без обработки инкрустацией. Для моделирования комбинированного действия засоления и засухи обработанные двумя способами семена пшеницы помещали в чашки Петри на фильтровальную бумагу, увлажненную раствором, содержащим 120 мМ NaCl и/или 20 % ПЭГ-6000 с осмотическим потенциалом – 0,5 МПа.

Семена проращивали в климатической камере Binder (Германия) при температуре 24 °С. Объем выборки составлял 50 семян в трехкратной повторности.

На 10 сутки определяли массу сырого и сухого вещества и накопление пролина в листьях и корнях.

Интенсивность роста оценивали по изменению сырой и сухой массы листьев и корней проростков гравиметрическим методом, фиксируя растительный материал в течение 5 мин при 110 °С и доводя его до постоянной массы при 60 °С. Содержание свободного пролина определяли с помощью кислого нингидринового реактива спектрофотометрически при 520 нм и рассчитывали по калибровочной кривой, построенной со стандартным L-пролином («Sigma»). Содержание пролина выражали в мкмоль на 1 г сырой массы [22].

Эксперименты проводили в 3-кратной биологической повторности. Статистическую обработку полученных результатов проводили по Г. Ф. Лакину [23], в таблице представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как показано в таблицах 1 и 2, влияние NaCl и ПЭГ-6000 приводило к значительному снижению прироста как сырой, так и сухой массы корней и листьев пшеницы. При этом комбинированное действие этих стрессовых факторов было более токсичным по сравнению с каждым из них в отдельности. Так, после замачивания семян в растворах наноселена в вариантах с NaCl прирост сухой массы корней и листьев по сравнению с контролем снизился на 14 и 9 %, с ПЭГ-6000 – на 20 и 11 %, а при комбинированном действии моделируемой засухи и засоления – на 24 и 20 % соответственно (табл. 1).

Однако после обработки семян наноселеном как замачиванием, так и инкрустацией масса корней и листьев увеличивалась. При сравнении индивидуального действия NaCl или ПЭГ-6000 результаты стимуляции роста корней и листьев после обработки наноселеном были близки. В опытах с ПЭГ-6000 прирост массы корней был на 3–5 % выше независимо от способа обработки семян (табл. 1, 2).

Сравнение результатов влияния наноселена на рост проростков пшеницы в опытах с комбинированным действием засоления и засухи, моделируемых NaCl и ПЭГ-6000, не показало ожидаемого уменьшения прироста массы сырого и сухого вещества корней и побегов по сравнению с индивидуальным стрессовым воздействием NaCl и ПЭГ-6000. В вариантах с комбинированным действием NaCl и ПЭГ-6000 прирост массы корней и листьев после замачивания семян в растворах наноселена увеличился на 14–24 % и 11–18 % соответственно (табл. 1). Близкие результаты были получены и после обработки семян инкрустацией наноселеном, когда увеличение массы корней составило 11–20 %, а листьев – 8–10 % (табл. 2).

Анализ полученных результатов показал, что как индивидуальное, так и комбинированное действие засоления и засухи оказывало наибольшее отрицательное воздействие на прирост массы корней во всех вариантах опыта без наноселена. В тоже время после обработки семян наноселеном как методом

замачивания, так и инкрустацией угнетение роста проростков было менее выражено на корневой системе по сравнению с листьями (табл. 1, 2).

В поддержании стрессоустойчивости растений участвует осмотически активные соединения, к которым относится пролин. Он не только обладает осморегуляторной и протекторной функциями, но также выполняет роль антиоксиданта [24, 25].

Таблица 1

Влияние замачивания семян пшеницы в растворах наноселена на массу сырого и сухого вещества 10-дневных проростков пшеницы в условиях комбинированного действия засоления и засухи

Вариант опыта	Масса сырого веществ, г		Масса сухого вещества, мг	
	корни	листья	корни	листья
Контроль	0,049	0,086	5,38±0,23	8,87±0,35
NaCl	0,031	0,075	4,62±0,15	8,06±0,33
NaCl + 10,0 мг/л Se ⁰	0,046	0,082	4,98±0,21	8,55±0,35
NaCl + 20,0 мг/л Se ⁰	0,054	0,095	5,52±0,23	9,11±0,37
NaCl + 30,0 мг/л Se ⁰	0,055	0,092	5,48±0,22	9,02±0,35
ПЭГ-6000	0,028	0,068	4,33±0,23	7,92±0,31
ПЭГ-6000 + 10,0 мг/л Se ⁰	0,034	0,084	4,81±0,22	8,44±0,33
ПЭГ-6000 + 20,0 мг/л Se ⁰	0,042	0,092	5,23±0,24	8,91±0,36
ПЭГ-6000 + 30,0 мг/л Se ⁰	0,058	0,094	5,37±0,23	8,88±0,35
NaCl + ПЭГ-6000	0,016	0,053	4,11±0,21	7,11±0,31
NaCl + ПЭГ-6000 + 10,0 мг/л Se ⁰	0,028	0,069	4,68±0,23	7,88±0,31
NaCl + ПЭГ-6000 + 20,0 мг/л Se ⁰	0,037	0,075	4,91±0,24	8,42±0,33
NaCl + ПЭГ-6000 + 30,0 мг/л Se ⁰	0,049	0,077	5,12±0,23	8,39±0,32

Таблица 2

Влияние инкрустации семян пшеницы в растворах наноселена на массу сырого и сухого вещества 10-дневных проростков пшеницы в условиях комбинированного действия засоления и засухи

Вариант опыта	Масса сырого веществ, г		Масса сухого вещества, мг	
	корни	листья	корни	листья
Контроль	0,049	0,086	5,38±0,23	8,87±0,35
NaCl	0,031	0,075	4,62±0,15	8,06±0,33
NaCl + 10,0 мг/л Se ⁰	0,046	0,082	4,67±0,21	8,25±0,35
NaCl + 20,0 мг/л Se ⁰	0,054	0,095	5,41±0,23	9,69±0,37
NaCl + 30,0 мг/л Se ⁰	0,055	0,092	5,40±0,22	9,61±0,35
ПЭГ-6000	0,028	0,068	4,33±0,23	7,92±0,31
ПЭГ-6000 + 10,0 мг/л Se ⁰	0,034	0,084	4,72±0,22	8,26±0,33
ПЭГ-6000 + 20,0 мг/л Se ⁰	0,042	0,092	5,11±0,24	8,79±0,36
ПЭГ-6000 + 30,0 мг/л Se ⁰	0,058	0,094	5,22±0,23	8,81±0,35
NaCl + ПЭГ-6000	0,016	0,053	4,11±0,21	7,11±0,31
NaCl + ПЭГ-6000 + 10,0 мг/л Se ⁰	0,028	0,069	4,57±0,23	7,72±0,31
NaCl + ПЭГ-6000 + 20,0 мг/л Se ⁰	0,037	0,075	4,78±0,24	8,21±0,33
NaCl + ПЭГ-6000 + 30,0 мг/л Se ⁰	0,049	0,077	4,92±0,23	8,28±0,32

Как показано на рис. 1, 2, накопление пролина в листьях и корнях пшеницы в условиях комбинированного стресса засолением и засухой было наиболее высоким. Однако с увеличением концентрации наноселена уровень пролина в листьях снижался на 29 %, а в корнях – на 3 %.

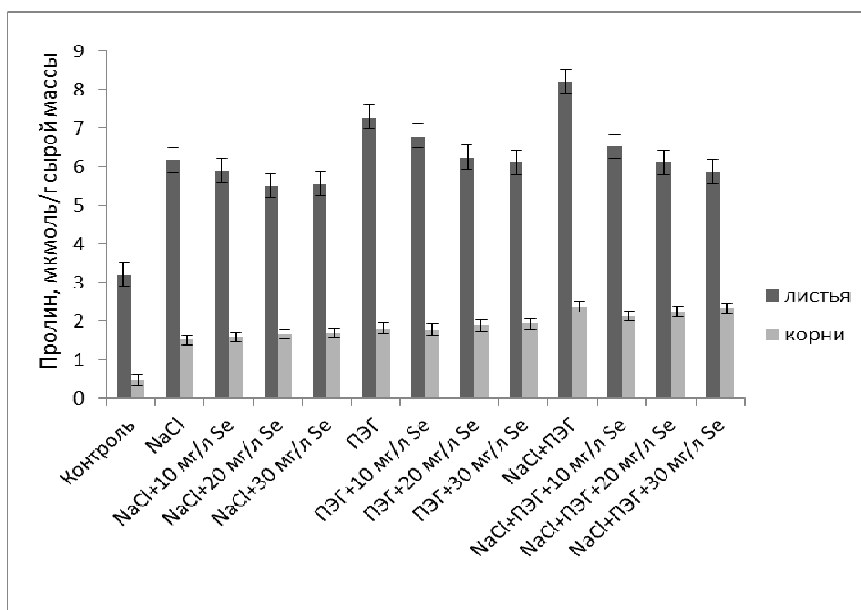


Рис. 1. Влияние замачивания семян пшеницы в растворе наноселена на содержание пролина в проростках в условиях комбинированного действия засоления и засухи.

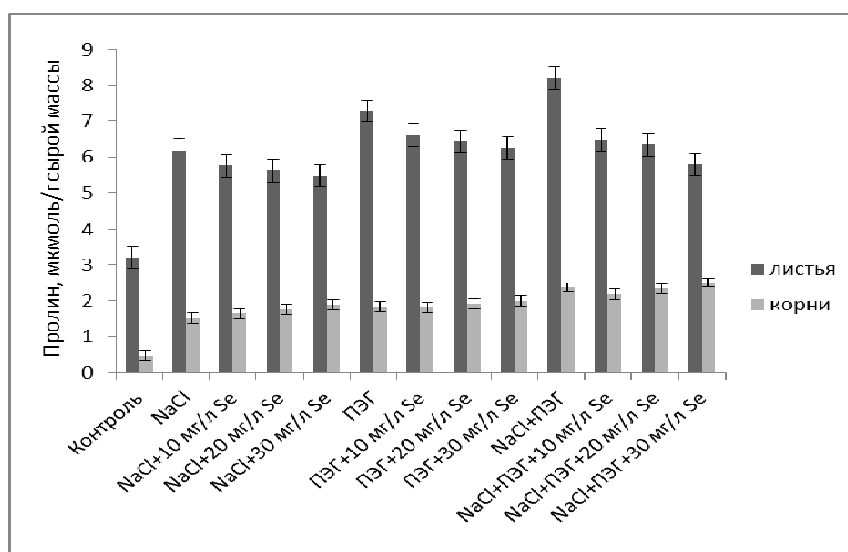


Рис. 2. Влияние инкрустации семян пшеницы наноселеном на содержание пролина в проростках в условиях комбинированного действия засоления и засухи.

Накопление пролина в клетках является неспецифической защитной реакцией растений на действие стресс-факторов различной природы [7, 8, 26].

Как показано на рисунке 1, 2, накопление пролина в листьях и корнях пшеницы в условиях стресса NaCl без обработки наноселеном увеличивалось на 1,9 и 3,2 раза соответственно. При моделировании засухи ПЭГ-6000 увеличение накопления пролина было значительно выше: в 2,3 раза в листьях и в 3,9 раза в корнях. В условиях комбинированного стресса засолением и засухой эти значения были наиболее высокими (в 2,6 раз в листьях и в 5,0 раз в корнях). Однако после обработки семян селеном как методом замачивания, так и инкрустации в условиях комбинированного стресса засолением и засухой уровень содержания пролина в листьях снижался на 29 %, а в корнях – на 3 %. Содержание пролина в корнях по сравнению с листьями было ниже в 3,5–4,0, что может быть связано с барьерными механизмами корневой системы [27].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, можно утверждать, что наноселен в условиях комбинированного засоления и засухи оказывает защитно-стимулирующее действие на проростки пшеницы независимо от способа предпосевной обработки.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Совета Министров Республики Крым в рамках научного проекта № 19-44-910003 p_a «Исследование закономерностей влияния нанокмпозиции селена на стрессоустойчивость пшеницы в условиях комбинированного действия засоления и засухи».

Список литературы

1. Шевелуха В. С. Проблемы, приоритеты и масштабы сельскохозяйственной биотехнологии в XXI веке / В. С. Шевелуха // Вестник РАСХН. – 2000. – № 4. – С. 5–13.
2. Иванов А. А. Совместное действие водного и солевого стрессов на фотосинтетическую активность листьев пшеницы разного возраста / А. А. Иванов // Физиология и биохимия культ. растений. – 2013. – Т. 45, № 2. – С. 155–163.
3. Wang W. B. Analysis of antioxidant enzyme activity during germination of alfalfa under salt and drought stresses / W. B. Wang, Y. H. Kim, H. S. Lee [et al.] // Plant Physiol Biochem. – 2009. – Vol. 4. – P. 570–577.
4. Miller G. Reactive oxygen signaling and abiotic stress / G. Miller, V. Shulaev, R. Mittler // Physiol Plant. – 2008. – Vol. 133. – P. 481–489.
5. Reactive oxygen species signalling in plants under abiotic stress / S. Choudhury, P. Panda, L. Sahoo [et al.] // Plant Signal Behav. – Vol. 8. – P. 236–281.
6. Reactive oxygen gene network of plants / R. Mittler, S. Vanderauwera, M. Gollery [et al.] // Plant Sci. – 2004. – Vol. 9. – P. 490–498.
7. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status / P. E. Verslues, M. Agarwal, S. Katiyar-Agarwal [et al.] // Plant J. – 2006. – 45, N 4. – P. 523–539.
8. Физиологические механизмы повышения солеустойчивости растений рапса брассиностероидами / М. В. Ефимова, А. Л. Савчук, Дж. А. К. Хасан [и др.] // Физиология растений. – 2014. – Т. 61, № 6. – С. 778–789.
9. Биологическая активность наноразмерного коллоидного селена / И. Н. Никонов, Ю. Г. Фолманис, Л. В. Коваленко [и др.] // Доклады академии наук. – 2012. – Т. 447, № 6. – С. 675–677.

10. Вихрева В. А. Влияние селена на рост, развитие и адаптивный потенциал козлятника восточного (*Galera orientalis*): автореф. дис. на соискан. учен. степ. канд. биол. наук / Валерия Александровна Вихрева – Москва, 2001. – 28 с.
11. Pennanen A. Protective role of selenium in plants subjected to severe UV irradiation stress / A. Pennanen, T. L. Xue, H. Hartikainen // J. Appl. Bot. – 2002. – Vol. 76. – P. 66–76.
12. Кузнецов В. Вл. Защитное действие селена при адаптации растений пшеницы к условиям засухи: автореф. дис. на соискан. учен. степ. канд. биол. наук / Василий Владимирович Кузнецов – Москва, 2004. – 21 с.
13. Головацкая И. Ф. Влияние селена на морфогенез и биохимические параметры растений *Triticum aestivum* L. в зависимости от селективного света / Головацкая И. Ф., Кулагина Ю. М., Крахалева А. В., Карначук Р. А. // Агрохимия. – 2013. – № 5. – С. 558–565.
14. Selenium an antioxidative protectant in soybean during senescence / M. Djanaguiraman, D. D. Devi, A. K. Shanker [et al.] // Plant Soil. – 2005. – Vol. 272. – P. 77–86.
15. Kong L. Selenium modulates the activities of antioxidant enzymes, osmotic homeostasis and promotes the growth of sorrel seedlings under salt stress / L. Kong, M. Wang, D. Bi // Plant Growth Regul. – 2005. – Vol. 45. – P. 155–163.
16. Nonsense mutations in folliculin presenting as isolated familial spontaneous pneumothorax in adults / R. B. Graham, M. Nolasco, B. Peterlin [et al.] // Am J. Respir Crit Care Med. – 2005. – Vol. 172, N 1. – P. 39–44.
17. Юркова И. Н. Влияние наночастиц селена и селенита натрия на рост и развитие растений пшеницы / И. Н. Юркова, А. В. Омельченко // Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского. Серия: «Биология, химия». – 2015. – Т. 1 (67), № 3. – С. 99–106.
18. Kuznetsov V. I. Polyamines and plant adaptation to saline environments / V. I. Kuznetsov, N. I. Shevyakova // Desert Plants / Ed. Ramawat K. A. Heidelberg; Dordrecht; London; New York: Springer Verlag, 2010. – P. 261–298.
19. Кулагина Ю. М. Влияние селенита натрия на рост и развитие растений пшеницы в зависимости от способа обработки / Ю. М. Кулагина, И. Ф. Головацкая // Вестник Томского государственного университета. Биология. – 2011. – № 2 (14). – С. 56–64.
20. Кильмакаев Т. А. Методы предпосевной обработки семян / Т. А. Кильмакаев // Успехи современной биологии. – 1991. – Т. 111, Вып. 1. – С. 134–137.
21. Пат. РФ 159620 МПК6 А 61 К 33/38, А 61 К 31/00. Способ получения водорастворимой композиции наночастиц, содержащей наночастицы селена / Юркова И. Н., Панова Э. П., Панов Д. А., Омельченко А. В.: патентообладатель Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского; – № 2015146880; заявл. 26.04.13; опубл. 10.02.16. Бюл. № 4.
22. Bates L. S. Rapid determination of free proline for water-stress studies / L. S. Bates, R. P. Waldren, I. D. Teare // Plant and Soil. – 1973. – Vol. 39. – P. 205–207.
23. Лакин Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.
24. Кузнецов Вл. В. Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция / Кузнецов Вл. В., Шемякова Н. И. // Физиология растений. – 1999. – Т. 46, № 2. – С. 321–336.
25. Sharma S. S. The Significance of Amino Acids and Amino Acid-Derived Molecules in Plant Responses and Adaptation to Heavy Metal Stress / Sharma S. S., Dietz K. J. // J. Exp. Bot. – 2006. – V. 57. – P. 711–726.
26. Джавадиан Н. Вызванные холодом изменения активности ферментов и содержания пролина, углеводов и хлорофиллов у пшеницы / Н. Джавадиан, Г. Каримзаде, С. Мафузи, Ф. Ганати // Физиология растений. – 2010. – Т. 57 (4). – С. 580–588.
27. Физиологические механизмы устойчивости растений *Solanum tuberosum* L. к хлоридному засолению / М. В. Ефимова, Л. В. Колосейчук, Е. В. Бойко [и др.] // Физиология растений. – 2018. – Т. 65, № 3. – С. 196–206.

**PROTECTIVE-STIMULATING INFLUENCE OF NANOSELEN DEPENDING
ON THE METHOD OF PRE-SEED TREATMENT OF WHEAT SEEDS UNDER
THE CONDITIONS OF THE COMBINED ACTION OF SALTIN AND DRAIN**

Yurkova I. N., Omelchenko A. V., Panov D. A.

*V. I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Crimea, Russia
E-mail: nanosilver@rambler.ru*

The combined effect of salinization and water deficiency reinforces each other and causes oxidative stress, which is dangerous for plants, and disrupts plant cell homeostasis. However, the protective mechanisms underlying the adaptation of plants to the combined effect of drought and salinity are poorly understood. An important role in adapting to stress belongs to selenium. The biological activity of selenium depends not only on its form, but also on the method of processing plants. Unlike foliar top dressing, pre-sowing seed treatment by soaking or inlaying in a composition with biologically active substances is more effective. The aim of the work was to study the protective-stimulating effect applied to wheat seedlings under the combined effects of salinization and drought, depending on the method of pre-sowing seed treatment.

The objects of study were winter wheat seeds (*Triticum aestivum* L.) of the «Zhneya» variety and the water-soluble composition of selenium nanoparticles. In dependence on the method of wheat seed treatment under the combined action of salinity and drought in the first case, the seeds were soaked for 4 hours in a nanoselen solution, in the second – treated method ohm inlay with surfactant «Liposam» in a concentration of 25.0 mg/L. The concentration of nanoselen was 10.0; 20.0 and 30.0 mg/L. To simulate the combined effect of salinization and drought, wheat seeds treated in two ways were placed in Petri dishes on filter paper moistened with a solution containing 120 mM NaCl and/or 20 % PEG-6000 with an osmotic potential of - 0.5 MPa. On day 10, the mass of raw and dry matter and the accumulation of proline in the leaves and roots were determined.

The influence of NaCl and PEG-6000 led to a significant decrease in the growth of both crude and dry mass of wheat roots and shoots. Moreover, the combined effect of these stress factors was more toxic compared with the action of each of them. However, after the seeds were treated with soot, both by soaking and incrustation, the mass of roots and shoots increased. An analysis of the results showed that both the individual and the combined effects of salinization and drought had the greatest negative effect on the increase in root mass in all variants of the experiment without application. It is shown that the accumulation of proline in shoots and roots of wheat under combined stress was highest. However, with increasing concentration, the level of proline in the leaves decreased by 29 %, and in the roots – by 3 %. It can be argued that nanoselen applied in conditions of combined salinization and drought has a protective and stimulating effect on wheat seedlings regardless of the method of foliar treatment.

Keywords: nanoselenium, salinization, drought, wheat, mass of roots and leaves, proline.

References

1. Sheveluha B. C., Problemy, priority i masshtaby sel'skohoziystvennoj biotekhnologii v XXI veke, *Vestnik RASHN*, **4**, 13 (2000).
2. Ivanov A. A., Sovmestnoe dejstvie vodnogo i solevogo stressov na fotosintetichesuju aktivnost' list'ev pshenicy raznogo vozrasta, *Fiziologija i biohimija kul't. rastenij*, **45**, (2), 163 (2013).
3. Wang W. B., Kim Y. H., Lee H. S. et al., Analysis of antioxidant enzyme activity during germination of alfalfa under salt and drought stresses, *Plant Physiol Biochem.*, **4**, 577 (2009).
4. Miller G., Shulaev V., Mittler R., Miller G. Reactive oxygen signaling and abiotic stress, *Physiol. Plant.* **133**, 489 (2008).
5. Choudhury S., Panda P., Sahoo L. et al., Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress, *Plant Signal Behav.*, **8** (4), 281 (2013).
6. Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M. et al., Reactive oxygen gene network of plants, *Plant Sci.*, **9**, 498 (2004).
7. Verslues P. E., Agarwal M., Katiyar-Agarwal S. et al., Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status, *Plant J.*, **45**, (4), 539 (2006).
8. Efimova M. V., Savchuk A. L., Hasan Dzh. A. K., Fiziologicheskie mehanizmy povysheniya soleustojchivosti rastenij rapsa brassinosteroidami, *Fiziologija rastenij*, **61**, 6 (2014).
9. Nikonov I. N., Folmanis Ju. G., Kovalenko L. V., Biologicheskaja aktivnost' nanorazmernogo kolloidnogo selena, *Doklady akademii nauk*, **447**, 6 (2012).
10. Vihreva V. A., Vlijanie selena na rost, razvitie i adaptivnyj potencial kozljatnika vostochnogo (*Galera orientalis*): avtoref. dis. na soisk. uchen. step. kand. biol. nauk (M., 2001).
11. Pennanen A., Xue T. L., Hartikainen H., Protective role of selenium in plants subjected to severe UV irradiation stress, *J. Appl. Bot.*, **76**, 76 (2002).
12. Kuznetsov V. V., Zashhitnoe dejstvie selena pri adaptacii rastenij pshenicy k uslovijam zasuhi: avtoref. dis. na soisk. uchen. step. kand. biol. nauk (M., 2004).
13. Golovackaja I. F., Kulagina Ju. M., Krahaleva A. V., Karnachuk R. A., Vlijanie selena na morfogenez i biokhimicheskie parametry rastenij *Triticum aestivum* L. v zavisimosti ot selektivnogo sveta, *Agrohimija*, **5** (2013).
14. Djanaguiraman M., Devi D. D., Shanker A. K. et al., Selenium an antioxidative protectant in soybean during senescence *Plant Soil.*, **272** (2005).
15. Kong L., Wang, D. Bi, Selenium modulates the activities of antioxidant enzymes, osmotic homeostasis and promotes the growth of sorrel seedlings under salt stress, *Plant Growth Regul.*, **45** (2005).
16. Graham R. B., Nolasco M., Peterlin B. et al., Nonsense mutations in folliculin presenting as isolated familial spontaneous pneumothorax in adults, *Am J. Respir Crit Care Med.*, **172** (1), 44 (2005).
17. Yurkova I. N., Omel'chenko A. V., Vlijanie nanochastich selena i selenita natrija na rost i razvitie rastenij pshenicy, *Uchenye zapiski Krymskogo federal'nogo universiteta imeni V. I. Vernadskogo. Serija: «Biologija, himija»*, **1** (67), 3 (2015).
18. Kuznetsov V. V., Shevyakova N. I., Polyamines and plant adaptation to saline environments, *Desert Plants* / Ed. Ramawat K. A. p. 261–298 (Heidelberg; Dordrecht; London; New York: Springer Verlag, 2010).
19. Kulagina Ju. M., Golovackaja I. F., Vlijanie selenita natrija na rost i razvitie rastenij pshenicy v zavisimosti ot sposoba obrabotki, *Vestnik Tomsogo gosudarstvennogo universiteta. Biologija*, **2** (14), 64 (2011).
20. Kil'makaev T. A. Metody predposevnoj obrabotki semjan, *Uspehi sovremennoj biologii*, **111** (1), 137, (1991).
21. Pat. RF 159620 MPK6 A 61 K 33/38, A 61 K 31/00. Sposob poluchenija vodorastvorimoj kompozicii nanochastich, soderzhashhej nanochasticy selena / I. N. Jurkova, Je. P. Panova, D. A. Panov, A. V. Omel'chenko: patentoobladatel' Krymskij federal'nyj universitet im. V. I. Vernadskogo; – № 2015146880; zajavl. 26.04.13; opubl. 10.02.16. Bjul. № 4.
22. Bates L. S., Waldren R. P., Teare I. D., Rapid determination of free proline for water-stress studies, *Plant and Soil.*, **39** (1973).
23. Lakin G. F., *Biometrija*, 352 p. (M.: Vyssh. shk., 1990).

24. Kuznecov V. I., Shevjakova N. I., Prolin pri stresce: biologicheskaja rol', metabolizm, reguljacija, *Fiziologija rastenij*, **46**, 2 (1999).
25. Sharma S. S., Dietz K. J., The Significance of Amino Acids and Amino Acid-Derived Molecules in Plant Responses and Adaptation to Heavy Metal Stress, *J. Exp. Bot.*, **57** (2006).
26. Dzhavadian N., Karimzade G., Mafuzi S., Ganati F., Vyzvannye holodom izmenenija aktivnosti fermentov i sodержanija prolina, uglevodov i hlorofillov u pshenicy, *Fiziologija rastenij*, **57**, 4 (2010).
27. Efimova M. V., Kolomejchuk L. V., Bojko E. V. i dr., Fiziologicheskie mehanizmy ustojchivosti rastenij *Solanum tuberosum* L. k hlорidnomu zasoleniju, *Fiziologija rastenij*, **65**, 3 (2018).

УДК 159.9.7:339.138

ВИЗУАЛЬНЫЙ НЕЙРОМАРКЕТИНГ: МЕТОДОЛОГИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИНСТРУМЕНТЫ

Ярош О. Б.

*Институт экономики и управления (структурное подразделение) ФГАОУ ВО Крымский
федеральный университет им. В. И. Вернадского, Симферополь, Республика Крым, Россия
E-mail: iarosh.olga@gmail.com*

В работе обсуждаются особенности методики проведения айтрекингowego нейромаркетингового эксперимента. Рассмотрены принципы работы современных систем отслеживания глаз, основанные на обнаружении аппаратными средствами центра зрачка и отражения роговицы в виде небольшого, яркого блика. Показаны проблемы, связанные с чувствительностью подобных систем к движениям головы, изменениям освещенности и влажности в лаборатории. Они связаны с ослаблением или отсутствием калибровки испытуемого. Поэтому приводятся рекомендации по оптимизации аппаратной идентификации. В статье особое внимание уделяется особенностям представления данных, полученных во время проведения нейромаркетинговых экспериментов. Получение качественных данных напрямую связано с обоснованием необходимого количества испытуемых, поскольку необоснованное количество участников приводит как удорожанию эксперимента, так и снижению качества данных. Поэтому приводятся требования к количеству участников эксперимента в зависимости от вида поставленной исследовательской задачи. Для экономических задач рассмотрены возможности применения выделенных зон интереса на примере наблюдения визуальной иерархии товаров в гипермаркетах.

Ключевые слова: нейромаркетинг, методика, эксперимент, айтрекинг, окулографические исследования.

ВВЕДЕНИЕ

Визуальный нейромаркетинг позволяет обеспечить уникальное понимание задач визуального поиска. При проведении стандартных маркетинговых исследований зачастую возникают две взаимосвязанные методологические проблемы. Первая связана с тем, около 10 % данных зачастую отбраковываются при обработке из-за разного вида ошибок, обусловленных неточностью понимания вопросов, а вторая – объясняется сознательным нежеланием респондента сообщать правдивую информацию. Преодоление данных противоречий возможно за счет использования окулографических инструментов (айтрекинга) для объективного измерения визуальных моделей, что позволяет на основе физиологических показателей получить объективные данные о внимании, восприятии и интересе.

Важность визуального нейромаркетинга в повседневной практике трудно не оценить. Это связано, как с низким входным порогом для проведения данных работ, так и с широким спектром исследовательских задач, которые возможно решать на основе инструментария визуального нейромаркетинга именно этим обусловлена актуальность и своевременность изучения данной темы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Поле зрения человека ограничено примерно 30 градусами, выше него человек замечает лишь движения и формы [1]. Плавное движение глаз на самом деле состоит из двух компонентов – фиксаций и саккад. Для компенсации узкого фовеального зрения глаз вынужден постоянно сканировать поле видимости быстрыми баллистическими скачками – саккадами. Они могут быть большими – при рассматривании объектов вдали и короткими, когда изучается объект, находящийся на близком расстоянии, например, при чтении. Саккады – это движения глаза, он их делает около 170 тысяч раз в день, каждая из которых длится около 20–40 мс. Во время саккады, когда глаза быстро перемещаются, не происходит обработка визуальной информации. Остановки между саккадами называются фиксациями, они занимают около 90 % совокупного времени просмотра визуального объекта [1]. Фиксации — это моменты, когда глаз относительно неподвижен, они обычно длятся около 200–500 мс. Именно в это время мозг получает и обрабатывает информацию.

Современные системы отслеживания глаз (айтрекеры) представлены разными типами технических устройств. Они могут быть как мобильными, так переносными и стационарными. Основной принцип их работы основан на обнаружении аппаратными средствами: а) центра зрачка; б) отражения роговицы в виде небольшого, яркого блика (Рис. 1).



Рис. 1. Механизм захвата взгляда айтрекером [2]

Относительное положение центра зрачка и отражения роговицы позволяют программному обеспечению рассчитывать местоположение взгляда испытуемого.

При проведении лабораторных экспериментов обычно используются два экрана, на первом экспериментатор ведет наблюдение за результатами, а на втором – предъявляются визуальные стимулы испытуемому (Рис. 2). Как правило, два экрана должны быть разнесены географически для минимизации проблемы

смещения испытуемого во время проведения тестирования. Опыт проведения окулографических исследований показывает, что освещение должно быть приглушенным и регулируемым. Желательно его проводить в помещении без окон либо с жалюзи, не пропускающими свет.



Рис. 2. Механизм айтрекингового тестирования с применением разделенных экранов.

Потому что системы отслеживания глаз весьма чувствительны к движениям головы, изменениям освещенности и влажности в лаборатории. Ослабление и отсутствие калибровки испытуемого может происходить из-за сухости глаз. Поэтому продолжительность тестирования не должна превышать 90 минут, при этом необходимо делать постоянные перерывы для отдыха глаз.

Поле зрения камеры айтрекера составляет около $20 \times 15 \times 20$ см (ширина $\times$ высота $\times$ глубина), поэтому испытуемый должен находиться на расстоянии 60 см от монитора. Это необходимо для устранения так называемого эффекта «ошибки компенсации движения головы». Для получения достоверных данных, айтрекер должен быть откалиброван под каждого испытуемого. Калибровка, как правило, осуществляется по пяти или девяти точкам, появляющимся последовательно на экране монитора (Рис. 3).

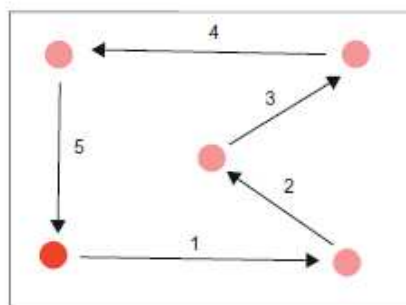


Рис. 3. Пример порядка калибровки айтрекера по пяти точкам.

Данная процедура позволяет провести аппаратную идентификацию местонахождения центра зрачка и блика. Для этого испытуемый должен следить за перемещением калибровочной точки на экране (Рис. 4). Процесс калибровки имеет ряд особенностей и ограничений, так она может быть затруднена из-за ряда причин:

- наличие очков у испытуемого;
- постоянно расширенный зрачок бывает, если человек выпил кофе или энергетический напиток незадолго до начала эксперимента;
- болезни глаз: глаукома и катаракта, поэтому желательный возраст испытуемых до 50 лет;
- косоглазие – расходящееся и сходящееся, зачастую приводит к потере видимости одного глаза айтрекером;
- слишком высокий или низкий рост испытуемых ведёт к нарушению стандартного расстояния до монитора и потере видимости глаз для айтрекера;
- волнение испытуемого, которое может вызывать движение головы;
- наклонение влево и вправо приводит к потере видимости айтрекером одного из глаз;
- наличие шляпы или другого головного убора;
- наличие длинной челки, накладных или очень сильно накрашенных ресниц в отдельных случаях также приводит к невозможности калибровки.

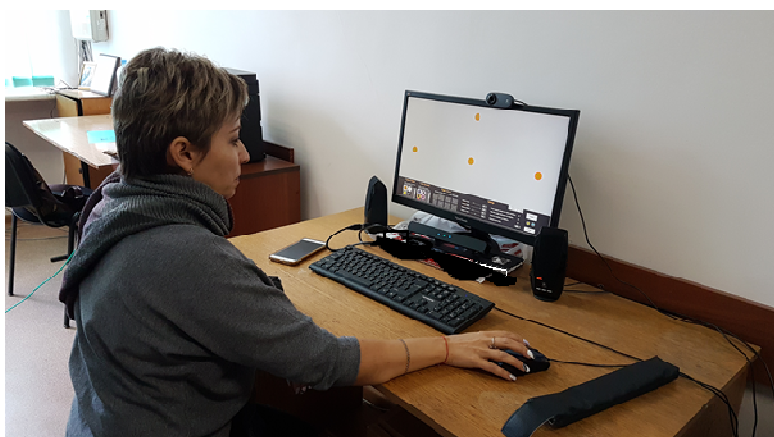


Рис. 4. Процесс калибровки испытуемого.

Поскольку человеческий глаз находится постоянно в процессе движения, то сбор данных айтрекером обусловлен частотой его дискретизации. Так, частота в 60 Гц позволяет записывать обзор каждые 16,6 мс, что является нижним порогом для проведения современных исследований. Информация, полученная с айтрекера, записывается специализированными программами Event ID, OGAMA для последующей обработки и интерпретации (Рис. 5).

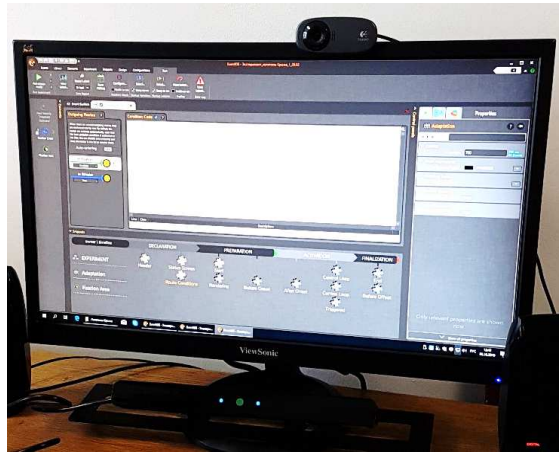


Рис. 5. Дизайн эксперимента, представленный в программе Event ID.

Информация, полученная во время эксперимента, представляет собой записи о фиксациях и саккадах (Рис. 6).

subject: Name	Trial: ID	Trial: Duration (ms)	Gaze: Fixations (count)	Gaze: Fixations (count/s)	Gaze: Fixation Duration Mean (ms)	Gaze:
Ибляизов	1	84150	231	2,745098	269,25974025974	166
Ибляизов	2	63091	182	2,884722	262,626373626374	165
Ибляизов	3	45654	132	2,891313	253,090909090909	150
Ибляизов	4	57093	178	3,11772	236,691011235955	133,5
Ибляизов	5	53690	165	3,073198	219,460606060606	150
Ибляизов	6	77701	192	2,471011	314,369791666667	182,5
Ибляизов	7	68327	202	2,956372	212,306930693069	150
Ибляизов	8	79579	242	3,041003	232,938036528926	149,5
Ибляизов	9	71058	211	2,969405	251,597156398104	166
Ибляизов	10	118718	327	2,754426	268,269113149847	150
Ибляизов	11	596	0	-1	-1	-1
Ибляизов	12	21822	60	2,749519	246,65	175
Ибляизов	13	42705	128	2,997307	215,0390625	133
Ибляизов	14	29583	87	2,940878	231,770114942529	133
Ибляизов	15	33760	77	2,808006	199,545454545455	150
Ибляизов	16	41859	124	2,962326	208,620967741935	141
Ибляизов	17	24419	59	2,416151	281,830508474576	133
Ибляизов	18	28942	79	2,729597	202,64569620253	102
Ибляизов	19	26772	70	2,614672	153,285714285714	116
Ибляизов	20	26797	71	2,64955	212,746478873239	133
Ибляизов	21	36946	74	1,990007	302,810810810811	133
Ибляизов	22	474	0	-1	-1	-1
Ибляизов	23	33627	71	2,111399	353,549295774648	200
Ибляизов	24	40239	100	2,485151	315,75	215,5
Ибляизов	25	11785	35	2,969877	223,4	167
Ибляизов	26	27200	62	2,279412	366,951612903226	290,5
Ибляизов	27	7137	23	3,222643	177,086956521739	150
Ибляизов	28	6241	19	3,044384	162,052631578947	100
Ибляизов	29	18853	62	3,288601	193,903225806452	150
Ибляизов	30	21738	55	2,530132	261,890909090909	150
Ибляизов	31	79246	218	2,750927	272,362385321101	150
Ибляизов	32	26185	65	2,482337	274,8	149
Ибляизов	33	573	0	-1	-1	-1
Ибляизов	34	19319	59	3,053988	208,186440677966	117
Ибляизов	35	20305	61	3,004186	240,754098360656	133
Ибляизов	36	48158	119	2,471033	309,53781512605	150
Ибляизов	37	49409	140	2,833492	257,842857142857	158
Ибляизов	38	16271	42	2,58128	276,166666666667	141,5
Ибляизов	39	48465	112	2,310946	353,044642857143	207,5
Ибляизов	40	14855	46	3,096601	237,347826086957	141,5
Ибляизов	41	69635	213	3,058807	249,4413145539	150
Ибляизов	42					
Ибляизов	43					
Ибляизов	44					
Ибляизов	45					
Ибляизов	46					
Ибляизов	47					
Ибляизов	48					
Ибляизов	49					
Ибляизов	50					
Ибляизов	51					
Ибляизов	52					
Ибляизов	53					
Ибляизов	54					
Ибляизов	55					
Ибляизов	56					
Ибляизов	57					
Ибляизов	58					
Ибляизов	59					
Ибляизов	60					
Ибляизов	61					
Ибляизов	62					
Ибляизов	63					
Ибляизов	64					
Ибляизов	65					
Ибляизов	66					
Ибляизов	67					
Ибляизов	68					
Ибляизов	69					
Ибляизов	70					
Ибляизов	71					
Ибляизов	72					
Ибляизов	73					
Ибляизов	74					
Ибляизов	75					
Ибляизов	76					
Ибляизов	77					
Ибляизов	78					
Ибляизов	79					
Ибляизов	80					
Ибляизов	81					
Ибляизов	82					
Ибляизов	83					
Ибляизов	84					
Ибляизов	85					
Ибляизов	86					
Ибляизов	87					
Ибляизов	88					
Ибляизов	89					
Ибляизов	90					
Ибляизов	91					
Ибляизов	92					
Ибляизов	93					
Ибляизов	94					
Ибляизов	95					
Ибляизов	96					
Ибляизов	97					
Ибляизов	98					
Ибляизов	99					
Ибляизов	100					

Рис. 6. Пример записи данных, полученных с айтрекера.

Они представляются в агрегированном виде по таким параметрам как: номер слайда; общая длительность фиксации на слайде, мс; количество фиксаций, ед; количество фиксаций ед/сек; средняя продолжительность фиксации, мс; медианная продолжительность фиксации, мс; коэффициент соотношения фиксации и саккад; средняя длина саккады, пикс; средняя скорость саккады, пикс/сек; длина саккады, пикс; скорость пути саккады, пикс/сек.

Зрительная система человека имеет тенденцию воспринимать разные визуальные стимулы с различной скоростью. Так, в исследовании К. Райнера [3]

было показано, что написанные слова фиксируются в среднем за 50-60 мс, порог для фиксации на изображениях людей около 150 мс. В некоторых работах [4] используется 100 мс порог для фиксации при выделении бессознательных паттернов на различных элементах веб-страниц. Границу бессознательной фиксации принято считать до 200 мс. Это время определяется синаптической задержкой прохождения нервного импульса по зрительному нерву к мозгу [5]. Фиксации менее 300 мс не кодируются в памяти, а, следовательно, не запоминаются [6], поэтому для выявления привлекающих внимание элементов используется порог выше 300 мс [7].

Наиболее удобным способом визуализации данных об отслеживании глаз являются тепловые карты, которые показывают интенсивность зрительских фиксаций на визуальных объектах. Они могут строиться по результатам от одного и более испытуемых. Различные цвета представляют на них уровни интенсивности (Рис. 7).



Рис. 7. Схема интенсивности фиксаций.

Схемы интенсивности фиксаций могут варьироваться в зависимости от цветового кодирования. В рамках данной работы мы выбрали указанную выше схему, где зоны наиболее видимые отмечены красным цветом, а наиболее просматриваемые – синим (Рис. 8)



Рис. 8. Тепловая карта.

Тепловые карты позволяют визуализировать фиксации испытуемых и дать наиболее информативный ответ об эффективных зонах визуального внимания. В коммерческих исследованиях они играют очень важную роль, а в исследовательских, научных целях тепловые карты используются просто как иллюстрации, поскольку тепловые карты не используются в статистическом анализе, хотя, безусловно, они отображают количественные закономерности. Кроме того, на тепловых картах не отображен порядок, в котором визуальные элементы были просмотрены испытуемым. Для решения этой задачи необходимо анализировать цепочку фиксаций (Рис. 9).



Рис. 9. Тепловая карта с последовательной схемой фиксаций.

Схема фиксаций (пути сканирования) позволяет определять начальную точку фиксации и их порядок, на основе которого испытуемый собирает информацию о визуальном объекте. Их паттерны позволяют идентифицировать уровень и порядок внимания, а также силу его рассеяния. Шаблоны просмотра позволяют в специализированной программе OGAMA наблюдать карты видимости визуальных объектов (Рис. 10).

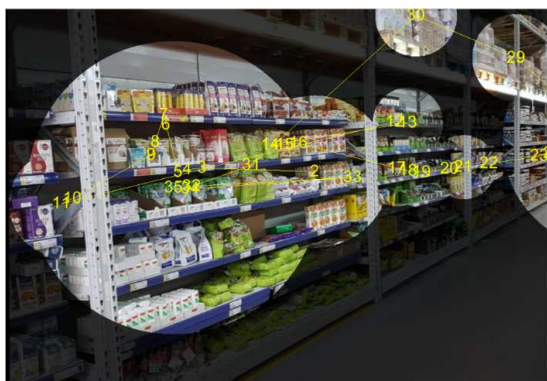


Рис. 10. Карта видимости.

Карты видимости, изображающие пути сканирования, являются ценным инструментом анализа в технологии проведения окулографических исследований. Схемы фиксаций объединяют числа и точки, изображающие порядок, в котором испытуемый рассматривал объект. Радиус зоны обозначает длительность в ней фиксации, чем она больше, тем значительней количество времени была в нее концентрация визуального внимания. Однако, зачастую основной исследовательской проблемой является понимание того, результаты какого количества испытуемых необходимо принимать во внимание на тепловых картах или при анализе путей сканирования? Это связано с тем, что большее количество людей дает пропорционально увеличенное количество точек, в результате подобные данные трудно анализировать.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Практически невозможно идентифицировать цифры на карте путей сканирования, когда изображены фиксации более чем одного человека, перенасыщенность информацией ухудшает обработку данных. Из-за высокого покрытия территории визуального стимула довольно трудно понять, что именно заинтересовало потребителя. Серьезная проблема данных визуализаций видна при просмотре динамических веб страниц и видео. Поэтому ключевым вопросом при проведении окулографических экспериментов является определение необходимого количества испытуемых для получения репрезентативных данных. Систематизация и обобщение литературных данных [8] по этому вопросу позволяет выделить сведения о необходимом числе участников окулографических исследований для получения репрезентативных результатов.

1. Исследование качественных зависимостей – от 5 до 15 испытуемых. Данное количество достаточно для выявления большинства проблем в юзабилити. Статистика показывает, что пять участников выявляют 85 % проблем, что вполне достаточно для большинства исследований. Однако, если группа испытуемых неоднородна, то количество испытуемых при тестировании разных потребителей должно составлять по 3–4 человека из каждой референтной группы [9].

2. Для выявления сходства между визуальными стимулами в задачах сортировки качества веб-сайтов достаточно проводить тестирование 15–20 человек. Это объясняется тем, что при тестировании 15 человек можно достичь корреляции в конечных результатах 0,90, после этого числа корреляция увеличивается очень незначительно, так 30 человек испытуемых дает корреляцию 0,95, а 60 человек показывает корреляцию на уровне 0,98. Затраты на тестирование в два раза выше, а качество данных улучшается только на 5 %. Подобная зависимость явно демонстрирует, что достаточность достигается на уровне в 15 человек [10].

3. Количественные исследования – от 20 до 33 испытуемых. При обработке данных для большинства статистических исследований необходимо убирать случайные выбросы показателей, поэтому, как правило, для этого рассчитывается среднее и стандартное отклонение. Когда происходит усреднение наблюдений из нормального распределения, стандартное отклонение (SD) среднего значения представляет собой SD отдельных значений, деленных на квадратный корень из

числа наблюдений. При получении количественных данных от 20 испытуемых около 6 % данных будут представлять собой выбросы и отбраковываться, таким образом в анализ будет включены данные 19 человек, что составляет минимально необходимое количество. Желательно, если позволяет бюджет исследования, для получения верифицированных данных количество респондентов в выборке доводить до 33 человек.

4. Пути сканирования – 6 человек. Данное количество испытуемых вполне достаточно для понимания паттернов повтора взгляда и выявления основных проблем в визуальном дизайне.

5. Для получения репрезентативных тепловых карт – 39 человек. Это связано с высоким уровнем переменной в тепловых картах в зависимости от числа испытуемых. Разных паттернах фиксации, уровне конгруэнтности среди референтных групп.

Тепловые карты позволяют увидеть влияние определенных элементов восприятия при просмотре визуальных стимулов [11]. Так в работе С. Джамаси [12] было показано, что в первую очередь испытуемые обращают внимание на лица, особенно при просмотре веб-страниц. Важность лиц в невербальном общении трудно отрицать, основываясь на аргументе о том, первое, что видит человек в своей жизни – это лицо и именно оно имеет важное значение для выживания и определения комфортной среды для индивидуума. Поэтому размещение картинок с лицами людей играет как положительную, так и отрицательную роль при отвлечении внимания от текста, находящегося рядом с подобным контентом. В связи с чем, рекомендуется синхронизировать контент, связанный с изображением лиц и смежной информации. В случае, если этого не достигается, то будет наблюдаться неэффективная коммуникация. Кроме того, при анализе тепловых карт существует возможность сравнения поведенческих паттернов в разрезе референтных групп. Так, в работе С. Джамаси [13] было проведено сопоставление визуального внимания между молодыми и пожилыми потребителями. Тепловые карты возрастных испытуемых содержали более интенсивные фиксации, зачастую зоны концентрации у них охватывали всю страницу, в то время как для молодых были характерны более нетерпеливые шаблоны поведения. Изучение объема зрительного внимания при нормальном старении проводятся Кротковой О. А и др [14]. В их работе отмечается, что у более возрастных испытуемых выявляется сужение объема зрительного внимания, за 10 секунд ими запоминалась только центральная информация, наблюдались ошибки свободного воспроизведения и узнавания стимулов. У более молодой группы выявлена тенденция к ассиметричному появлению ошибок, стимулы, расположенные справа, хуже воспроизводились вербально, а слева – меньше узнавались. Различия в поведенческих паттернах связаны с необходимостью учета эффектов конгруэнтности при рассмотрении референтных групп испытуемых.

Помимо тепловых карт и анализа путей сканирования, данные по фиксациям и саккадам могут применяться для визуализации информации целевых областей или зон интереса (AOI). Чтобы иметь представление об апперцепции в определенных

областях, используются специальные выделенные зоны интереса. Они создаются различными способами в зависимости от исследовательской задачи.

Существует четыре вида основных параметров, которые можно использовать для исследования зон интереса: продолжительность фиксации, частота, время и процент зрителей. Первая метрика относится к времени, в течение которого визуальный элемент находился в зоне внимания. Вторая – показывает количество раз, при котором была замечена зона интереса, третья – указывает время, в течение которого был просмотрен элемент, а последняя демонстрирует процент испытуемых, которые проявили внимание к визуальным элементам. Зоны интереса (AOI) могут быть широкими (Рис. 11), то есть охватывать все части страницы или узкими, когда выделяется одна или несколько зон (Рис. 12).



Рис. 11. Широкая зона интереса.

При данном виде анализе подсчитываются количество фиксаций, их общее время, средняя продолжительность фиксаций по всему визуальному стимулу, разбитому равномерно на прямоугольные зоны. Таким образом, можно проанализировать варианты смещения визуального внимания с конкретизацией, на какие именно объектные зоны они пришлись.

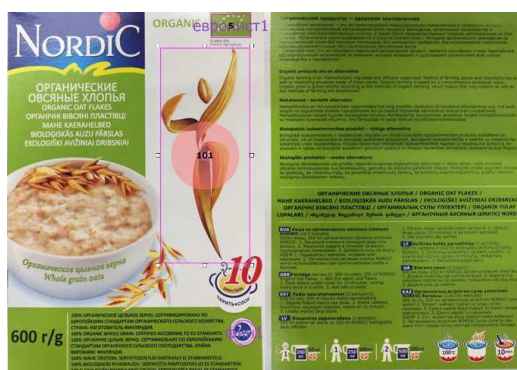


Рис. 12. Узкая зона интереса.



Аналогичная проблема возникает при анализе частоты фиксации – высокие показатели могут указывать либо на интерес, или на путаницу (Рис. 14).



243

Поэтому для правильной интерпретации необходимо включать в анализ дополнительные метрики, демонстрирующие отношения между величинами и параметрами. Порядок просмотра или пути сканирования предоставляют ценную информацию для раскрытия механизмов пользовательского сканирования стимульного материала.

По данным агрегированных карт зон интереса выявляются области распределения внимания по визуальному стимулу. Чем выше совокупное время фиксации, тем вероятней, что данная область привлекательна для потребителя, а, следовательно, выбранные товары будут в указанных зонах. Для конкретизации данного анализа применяется расчет процента людей, которые смотрели на выделенные области размещения товаров. Время фиксации воспринимаемого элемента может косвенно указывать на то, насколько быстро испытуемые заметили визуальный элемент.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С точки зрения психологии [15] по окуломоторной активности можно определять: содержание восприятия, способ выполнения решаемой задачи, область интереса испытуемого, его состояние, характер выполняемых действий и индивидуально-психологические особенности глазодвигательной системы. Последняя имеет иерархическую организацию, поэтому при изучении познавательных процессов основной единицей анализа являются паттерны движения глаз или окуломоторные структуры. Для их исследования необходимо осуществлять целостный взгляд на природу перцептивного процесса, рассмотрение его во всем многообразии и сложности [16]. Благодаря современным инструментам, это становится возможным на качественно новом уровне и дает возможность получать новые данные о природе когнитивных процессов.

Исследование выполнено при поддержке Программы развития ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского» на 2015–2024 годы по проекту «Лаборатория нейромаркетинга и поведенческой экономики» И/2018/20. Приказ №704 от 28.08.2018.

Список литературы

1. Duchowski A. Eye tracking methodology: Theory and practice / Duchowski A. – Berlin- Heidelberg: Springer, 2007. – P.144–158.
2. Meunier F. On the automatic implementation of the eye involuntary reflexes measurements involved in the detection of human liveness and impaired faculties / In Y.-S. Chen (Ed.), Image processing. – 2009. Retrieved from <http://www.intechopen.com/books/image-processing/on-theautomaticimplementation-of-the-eye-involuntary-reflexes-measurements-involved-in-the-detectiv>
3. Rayner K. Eye movements and attention in reading, scene perception, and visual search / Rayner K. // The Quarterly Journal of Experimental Psychology. – 2009. – № 62(8). – P. 1457–1506.
4. Buscher G. The good, the bad, and the random: An eye-tracking study of ad quality in web search / Buscher G., Dumais S. T., & Cutrell E. // Proceedings of the 33rd International ACM SIGIR Conference on Research and Development in Information Retrieval. – 2010. – P. 42–49.

5. Graf W. Ergonomic evaluation of user-interfaces by means of eye-movement data / Graf W., Krueger H. // Proceedings of the third international conference on human-computer interaction. – 1989.: Elsevier Science Inc. – P.659–665.
6. Mancas M. Memorability of natural scenes: the role of attention / Mancas M., Le Meury O. // Conference paper. – 2013. Режим доступа: http://people.irisa.fr/Olivier.Le_Meur/publi/2013_ICIP/Mancas_ICIP_2013.pdf; Дата обращения: 10.11.2019. DOI:10.1109/icip.2013.6738041.
7. Djasasbi S. Generation Y, web design, and eye tracking / Djasasbi S., Siegel M., Tullis T. // International Journal of Human-Computer Studies. – 2010. – № 68(5). – P. 307–323.
8. Pernice K. How to conduct eyetracking studies / Pernice K., Nielsen J. – Warm Springs: Nielson Norman Group, 2009. – 160 p.
9. Nielsen J. A mathematical model of the finding of usability problems / Nielsen J. Landauer T. // Proceedings of ACM INTERCHI'93 Conference, 24-29 April 1993. – P. 206–213.
10. Tullis T. How Many Users Are Enough for a Card-Sorting Study? / Tullis T. and Wood Larry // Usability Professionals Association (UPA). – 2004 Conference, Minneapolis, MN. – June 7–11, 2004.
11. Tullis T. Are people drawn to faces on webpages? / Tullis T., Siegel M., Sun E. // CHI'09 Extended. Abstracts on Human Factors in Computing Systems, ACM. – P. 4207–4212.
12. Djasasbi S. Faces and viewing behavior: An exploratory investigation / Djasasbi S., Siegel M., Tullis T. // Transactions on Human-Computer Interaction. – 2012. – № 4(3). – P. 190–211.
13. Djasasbi S. Eye Tracking and Web Experience / Djasasbi Soussan // AIS Transactions on Human-Computer Interaction. – 2014. – № (6) 2. – P. 16–31.
14. Кроткова О. А. Объем зрительного внимания при нормальном старении: айтрекинг-исследование / Кроткова О. А., Данилов Г. В., Каверина М. Ю., Кулева А. Ю., Гаврилова Е. В., Ениколопова Е. В. // Вестник МГУ. Серия 14. Психология. – 2018. – № 1. – С. 21–36.
15. Айтрекинг в психологической науке и практике / Под ред. В. А. Барабанщикова. – Москва: Межрегиональная ассоциация экспериментальной психологии, 2015. – С. 24–31.
16. Ярош О. Б. Нейромаркетинг: новые возможности в исследовании потребительского поведения / Ярош О. Б. // Экономика и бизнес: теория и практика. – 2018. – №7 – С. 149–153

VISUAL NEUROMARKETING: RESEARCH METHODOLOGY AND INSTRUMENTS

Yarosh O. B.

*V. I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Crimea, Russian Federation
E-mail: iarosh.olga@gmail.com*

The paper discusses the features of the methodology for conducting an eye tracking neuromarketing experiment. When conducting standard marketing research, two interconnected methodological problems often arise. The first is due to the fact that about 10 % of the data is often rejected during processing due to different types of errors due to inaccurate understanding of the issues, and the second is due to the respondent's conscious reluctance to provide true information. Overcoming these contradictions is possible through the use of eye tracking for the objective measurement of visual models, which allows us to obtain objective data on attention, perception and interest based on physiological metrics. The article discusses the principles of operation of modern eye tracking systems, based on hardware detection. The problems associated with the sensitivity of such systems to head movements, changes in light and humidity in the

laboratory are shown. These problems are largely related to the weakening or lack of calibration of the subject. Therefore, recommendations are given on optimizing the hardware identification of the location of the center of the pupil and improving the calibration process. The article focuses on the features of the presentation of data obtained during neuromarketing experiments, in particular, heat map data allows visualization of subjects' fixations and gives the most informative answer about effective areas of visual attention. While fixation schemes allow you to determine the starting point of fixation and their order, on the basis of which the subject collects information about the visual object. Their patterns make it possible to identify the level and order of attention, as well as the strength of its scattering. Moreover, obtaining qualitative data is directly related to the justification of the required number of subjects who will need to be involved in the experiment. An unreasonable number of participants leads to both an increase in the cost of the experiment and a decrease in the quality of the data. Therefore, the requirements for the number of participants in the experiment are given depending on the type of research task. Economic problems, the possibilities of using the selected zones of interest by observing the visual hierarchy of goods in a hypermarket are examined. It is proposed to distinguish two types of zones - wide and narrow, depending on research tasks related to understanding the mechanisms of apperception. It is indicated that for a correct interpretation, it is necessary to include additional metrics in the analysis that demonstrate the relationship between values and parameters. The viewing order or scanning paths provide valuable information for revealing the mechanisms for custom scanning of stimulus material.

Keywords: neuromarketing, methodology, experiment, eye tracking, visual.

References

1. Duchowski A. Eye tracking methodology: *Theory and practice* (Springer, 2007).
2. Meunier F. On the automatic implementation of the eye involuntary reflexes measurements involved in the detection of human liveness and impaired faculties / In Y.-S. Chen (Ed.), *Image processing*. 2009. Retrieved from <http://www.intechopen.com/books/image-processing/on-the-automatic-implementation-of-the-eye-involuntary-reflexes-measurements-involved-in-the-detectiv>
3. Rayner K. Eye movements and attention in reading, scene perception, and visual search, *The Quarterly Journal of Experimental Psychology*, **62**, 8 (2009).
4. Buscher G., Dumais, S. T., & Cutrell E. The good, the bad, and the random: An eye-tracking study of ad quality in web search *Proceedings of the 33rd International ACM SIGIR Conference on Research and Development in Information Retrieval*.-2010.-P. 42–49.
5. Graf W., Krueger H. Ergonomic evaluation of user-interfaces by means of eye-movement data *Proceedings of the third international conference on human-computer interaction*. (Elsevier Science Inc. 1989) p.659-665.
6. Mancas M., Le Meury O. Memorability of natural scenes: the role of attention *Conference paper* (september 2013). Access: http://people.irisa.fr/Olivier.Le_Meur/publi/2013_ICIP/Mancas_ICIP_2013.pdf; DOI:10.1109/icip.2013.6738041.
7. Djamasbi S., Siegel M., Tullis T. Generation Y, web design, and eye tracking *International Journal of Human-Computer Studies*, **68**, 5, (2010).
8. Pernice K., Nielsen J. *How to conduct eyetracking studies* (Warm Springs: Nielson Norman Group, 2009).
9. Nielsen J., Landauer Thomas K. A mathematical model of the finding of usability problems *Proceedings of ACM INTERCHI'93 Conference* (Amsterdam, The Netherlands, 24-29 April 1993), p. 206–213.
10. Tullis T., Wood L. *How Many Users Are Enough for a Card-Sorting Study?*, Usability Professionals Association (UPA) 2004 Conference, Minneapolis, MN, June 7–11, 2004.

11. Tullis T., Siegel M., Sun E. Are people drawn to faces on webpages? CHI'09 *Extended Abstracts on Human Factors in Computing Systems*, ACM, 4207-4212.
12. Djamasbi S., Siegel M., Tullis T. Faces and viewing behavior: An exploratory investigation. *Transactions on Human-Computer Interaction*, **4**, 3, (2012).
13. Djamasbi S. Eye Tracking and Web Experience, *AIS Transactions on Human-Computer Interaction*, **6**, 2, (2014).
14. Krotkova O. A., Danilov G. V., Kaverina M. Yu., Kuleva A. Yu., Gavrilova E. V., Enikolopova E. V. The amount of visual attention in normal aging: aitracking research, *Bulletin of Moscow State University, Series 14, Psychology* **1**, 21 (2018).
15. *Eyetracking in psychological science and practice* / Ed. V. A. Barabanshchikova. (Interregional Association of Experimental Psychology, 2015)
16. Yarosh O. B. Neuromarketig: new opportunities in the study of consumer behavior, *Economics and business: theory and practice.*, **7**, 149 (2018).

Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского
Биология. Химия. Том 5 (71). 2019. № 4. С. 248–261.

УДК 577.152

АНАЛИЗ ПРОБЛЕМЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Вяткина О. В.¹, Бажин В. Ю.¹, Александрова Д. Д.²

¹*Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского», Симферополь, Республика Крым, Россия*

²*Химико-биологический кластер федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики»², Санкт-Петербург, Россия
E-mail: oksana_vyatkina@list.ru*

В статье представлен анализ проблемы репрезентативности исследовательских данных по определению активности ферментов относительно различных субстратов. На примере растительных пероксидаз показана ограниченность методов определения ферментативной активности при высокой субстратной специфичности фермента. Разработана схема определения пероксидазной активности препаратов по субстрату-восстановителю фенолу, указаны оптимальные параметры процесса. Показано, что использование аналитической реакции фенола с 4-аминоантипирином позволяет применять его как субстрат-восстановитель для воспроизводимого оценивания пероксидазной активности очищенных ферментов и ферментных препаратов. Предложен способ косвенного определения пероксидазной активности ферментных препаратов по фенолу, основанный на использовании калибровочных зависимостей, полученных при изучении активности ферментных препаратов с известной степенью очистки в качестве стандарта.

Ключевые слова: пероксидаза, ферментативная активность, фенол, калибровочный график.

ВВЕДЕНИЕ

Уникальная специфичность ферментов и высокие скорости реакций с их участием делают ферменты и препараты, созданные на их основе привлекательными для решения многих задач промышленности, сельского хозяйства, экологии, медицины. Основными источниками ферментов являются «живые» клетки, различного происхождения, но однозначно являющиеся многокомпонентными системами сложного химического состава и физико-химических свойств. Подавляющее большинство ферментов – это вещества белковой природы. Хотя в настоящее время разработаны схемы синтеза и химической модификации активных центров некоторых ферментов, в виду трудоемкости и высокой стоимости данных схем, основным методом получения

ферментов до сих пор является их выделение из биологических объектов. Извлечение фермента из клеточной среды как правило сопряжено с изменением его активности и избирательности под воздействием новых внешних факторов (Т, Р, рН). Для стабилизации фермента, а иногда для повышения его активности проводят процессы очистки препарата либо иммобилизацию. В результате перед исследователями, особенно прикладной направленности, не зависимо от того, где планируется использование полученных препаратов: в аналитических целях либо в технологических схемах, возникает проблема определения их активности и получения при этом данных, которые можно было бы сравнивать с другими данными не зависимо от метода исследования.

При выборе метода необходимо учитывать, что время анализа часто важнее точности. Например, на этапе выделения фермент может инактивироваться по ряду причин, поэтому, затягивать данный этап не целесообразно. То есть, метод, позволяющий за 10 минут определить активность фермента с погрешностью в 5 % предпочтительнее того, что за 30 минут определит активность с погрешностью в 1 %.

Большую сложность представляет работа с выделенными из растительного сырья неочищенными ферментными препаратами, часто содержащими фермент в микроколичествах. При определении активности фермента в таких системах необходимо подобрать правильную «единицу активности», которая бы количественно выражала его чистоту и эффективность действия [1]. В научной среде проблема выбора единиц активности фермента стоит очень остро. Многие исследователи отмечают, что единицы измерения активности, полученные для одного и того же фермента различной степени очистки в системах различного состава относительно разных субстратов сравнивать некорректно, тем более делать выводы об активности фермента и его препаратов относительно других субстратов [2]. Относительно стандартные единицы активности встречаются в работах, где фермент используется в «чистом виде», то есть с заранее установленной степенью очистки, которая чаще всего характеризуется RZ-фактором. За единицу активности (е. а) в таких работах часто принимают количество фермента, окисляющее 1 мкмоль вещества за 1 минуту. Но даже в таких случаях единицы измерений самого количества фермента часто не регламентируются, это может быть, например, массовая доля в мкг фермента на мг материала, молярность раствора фермента, а значит и единицы активности фермента будут отличаться [3–5]. Также для выражения ферментной активности применяются такие единицы как «Катал» и «Молекулярная активность». Последняя единица используется исключительно для чистых ферментов [6–8]. Единицы активности фермента могут выбираться и с учётом изученности структуры фермента. Так, если известно точное количество активных центров в молекуле фермента, то можно использовать «активность каталитического центра» характеризующаяся таким числом молекул субстрата, которое превращается за 1 мин, в расчете на один активный центр. Хотя данная единица активности встречается крайне редко.

Из-за дороговизны чистых ферментов, зачастую в исследованиях используются ферментные препараты, самостоятельно полученные из биоматериалов. Как

правило, оценивание точных концентраций ферментов в таких системах проблематично, поэтому многие авторы предпочитают уходить от абсолютных количественных единиц активности, заменяя их относительными показаниями. При этом, описывая активность исследуемого ферментного препарата, относя его активность к стандартному образцу этого фермента, измеренные в одинаковых условиях, снижается погрешность определения его активности [5–14]. Так же условной единицей активности может выступать изменение оптической плотности системы [15], объем выделившегося или поглощенного в индикаторной реакции газа, интенсивность люминесценции, другое легко регистрируемое изменение системы, вызываемое конкретным количеством фермента, например, массой белка, находящейся в пробе, массой исследуемого препарата, массой исходного растительного сырья, объемом ферментного препарата, полученного из растительного сырья, за определённый промежуток времени [16].

В наших исследованиях для создания аналитических тест-систем и катализаторов водоочистки мы используем препараты с пероксидазной активностью, выделенные из растительного сырья. Пероксидаза является строго специфичной по отношению к пероксиду водорода и широко специфичной – к другим органическим и неорганическим субстратам, среди которых в качестве стандартов обычно применяют пирокатехин (о-диоксибензол), пирогаллол (1,2,3-тригидроксибензол), гваякол (2-метоксифенол), бензидин (4,4'-диаминодифенил), о-дианизидин, 2,2-азинобис-(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая) кислота (АБТС) и так далее [16, 17]. Однако спектр субстратов-восстановителей пероксидазы намного шире, с чем и связан практический интерес в ее применении, а количество стандартных методик определения ограничено, как и не существует единообразия в количественном выражении единиц активности фермента, что вызывает сложности в оценке эффективности работы катализатора и определении механизма его действия. Также практический интерес представляет сравнение ферментной активности таких препаратов с неким стандартом, в качестве которого выступает, как правило, коммерческая пероксидаза хрена (*Horseradish peroxidase, HRP*) известной степени очистки (*RZ*), активность которой определена производителем по одному из выше перечисленных субстратов, что не дает возможности каким-то образом предположить ее активности относительно иных субстратов, даже близких по химической природе к выше указанным в реальных окислительных системах сложного состава.

Так, например, известно, что фенол является экотоксикантом, попадающим в сточные воды предприятий бумажного, нефтяного, полимерного производств, производств каучука и стали. При хлорировании воды в процессе водоочистки могут образовываться более токсичные производные хлорфенолы [18]. Именно для удаления фенола и его хлорпроизводных из сточных вод в процессе доочистки чаще всего и используются пероксидазы [19]. Вполне логично и полезно было бы при разработке новых ферментных катализаторов с пероксидазным действием оценивать их активность именно относительно реальных загрязнителей, сравнивая ее с активностью эталонного фермента и при этом получать унифицированные,

имеющие тождественный физический смысл данные, пригодные для сопоставления и анализа. Однако методика определения активности фермента по этим субстратам отсутствует, вследствие многокомпонентности систем, сложности механизмов протекающих реакций и проблем подбора аналитических реагентов для контроля остаточных концентраций субстрата. В связи с этим для нас интерес представляла разработка унифицированного способа определения пероксидазной активности ферментных препаратов на примере нестандартного субстрата восстановителя – фенола.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлась пероксидаза, выделенная из корнеплодов редьки черной (*Raphanus sativus* 'Niger'). Экстрагировали фермент фосфатным буфером (рН=7) из очищенного и измельченного растительного сырья. Экстракцию проводили по методике, описанной Селибером без дальнейшей очистки [20]. Супернатант отделяли от растительной массы центрифугированием при 5000 об., содержание нативной пероксидазы в нем оценивали по количеству активных центров феррипорфирина пероксидазы (далее а.ц.) в единице объема, фотоколориметрически ($\lambda = 400$ нм, $l = 2$ см, $\varepsilon_{400} = 9,6 \cdot 10^4 \frac{\text{л}}{\text{моль} \cdot \text{см}}$) [3]. В качестве

стандарта использовали очищенную пероксидазу хрена (HRP), (производитель: «Budapest Hungary», RZ 0,6). Общее содержание белка в системах, содержащих фермент, определяли биуретовым методом по калибровочному графику ($\lambda = 540$ нм, $l = 1$ см) [21].

В качестве субстрата-окислителя использовали пероксид водорода производства «РОСБИО», точную концентрацию которого устанавливали методом перманганатометрического титрования [22].

Субстратом-восстановителем был выбран фенол, чда, производства «ВИТАХИМ», дополнительно очищенный перегонкой. Концентрацию фенола в водных растворах определяли фотоколориметрически, по реакции с 4-миноантипирином в присутствии катионов Fe^{3+} , (рН=10,0, $\lambda=470$ нм, $l=1$ см) [23]. Все фотоколориметрические определения проводили на приборе ЭКСПЕРТ-003.

В связи с тем, что нами не было найдено сведений об использовании чистого фенола в качестве субстрата для определения активности ферментных препаратов на основе пероксидазы, на первом этапе исследований возникла необходимость в разработке такого метода. Для этого было необходимо подобрать оптимальные условия: время экспозиции, концентрацию фермента и концентрации субстрата-окислителя, при которых количество субстрата-восстановителя в системах изменялось бы со временем линейно. Это необходимо для определения начальной скорости реакции, а, следовательно, и активности ферментного препарата.

Суммарный объем системы составлял 0,05 л. Систему А – стандарт: пероксидаза хрена RZ 0,6, H_2O_2 , $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$, использовали для подбора оптимальных условий определения активности пероксидазы по фенолу. Система В - тестовая: фосфатно-буферный экстракт пероксидазы редьки черной, H_2O_2 , $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$. Концентрацию (а.ц.) фермента в системах варьировали от $1 \cdot 10^{-9}$ до $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л, что

соответствовало $C(HRP)=4 \cdot 10^{-2} - 4 \cdot 10^2$ мг/л. Концентрацию H_2O_2 в системе А варьировали от 1 до $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л, содержание фенола от $3 \cdot 10^{-6}$ до $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л. В системе В использовали установленные по результатам исследования системы А оптимальные концентрации субстратов окислителя и восстановителя.

В качестве растворителя во всех системах использовали фосфатный буфер с $pH = 7$. Все измерения проводили при комнатной температуре ($t = 25^\circ C$). Время экспозиции, τ , при подборе оптимальных условий определения начальных скоростей реакции варьировали в интервале 1 – 30 мин. По истечении заданного времени в систему добавляли 1 мл 1 М H_2SO_4 для инактивации фермента и остановки реакции. Скорость реакции определяли по изменению концентрации фенола.

Активность ферментных препаратов определяли по начальной скорости окисления субстрата-восстановителя. За единицу удельной активности, при работе с очищенным ферментом, приняли количество субстрата (мкМ), окисленного в присутствии 1 мг ферментного препарата на протяжении 1 минуты, по формуле:

$$A = \frac{\Delta C \cdot V}{g \cdot \tau} \quad (1)$$

Где: ΔC – изменение концентрации субстрата (мкмоль/л) за время экспозиции системы τ (мин); V – объем окислительной системы (л); g – навеска ферментного препарата (мг).

За единицу молярной активности, при работе с очищенным ферментом, приняли количество субстрата (мкМ), окисленного в присутствии 1 моль ферментного препарата на протяжении 1 минуты, по формуле:

$$A = \frac{\Delta C \cdot V}{n \cdot \tau} \quad (2)$$

Где: ΔC – изменение концентрации субстрата (мкмоль/л) за время экспозиции системы τ (мин); V – объем окислительной системы (л); n – количество вещества ферментного препарата (моль).

В системах В активность нативной пероксидазы, выражали так же количеством субстрата (мкМ), окисленного в присутствии 1 мкмоль активных центров ($n_{a.c.}$) ферментного препарата за 1 минуту.

По данным определения активности по фенолу для стандарта – очищенной пероксидазы, строили различные виды калибровочных зависимостей, связывающих аналитический сигнал с массой и количеством а.ц. фермента. Данные зависимости использовали для оценки активности пероксидазы, экстрагированной из растительного сырья без дополнительной очистки. Обработку результатов проводили методами математической статистики в программе «Microsoft Excel».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследований показали, что в системах (А), при фиксированной начальной концентрации фенола $5 \cdot 10^{-4}$ М в присутствии различных концентраций пероксида водорода и варьировании времени экспозиции τ , наблюдалось линейное

снижение оптической плотности аналитического раствора, а, следовательно, уменьшение остаточной концентрации фенола в системе в течении первых 10 мин. После чего наблюдалось возрастание фиктивного светопоглощения вследствие появления в системе мути, обусловленной конденсацией продуктов окисления фенола [24]. В виду чего временем экспозиции во всех дальнейших экспериментах было выбран промежуток 10 мин.

Варьирование содержания субстрата окислителя в системах (А) показало, что при концентрации H_2O_2 ниже $1 \cdot 10^{-3}$ М достоверно определяемых изменений концентрации фенола в течении времени экспозиции не происходило. Аналогичная картина наблюдалась при внесении в системы пероксидазы в концентрациях ниже $1 \cdot 10^{-8}$ М. Поэтому мы ограничились, в дальнейших исследованиях, более узкими интервалами концентраций указанных компонентов. Так в системах с фиксированной концентрацией фермента $1 \cdot 10^{-7}$ М (A_1) и $1 \cdot 10^{-6}$ М (A_2) были получены зависимости скорости реакции от начальной концентрации субстрата окислителя, показанные на (рис. 1, 2). Видно, что при малых концентрациях субстрата-окислителя эти зависимости носят линейный характер, что соответствует первому порядку реакции по основному субстрату. При концентрациях пероксида водорода больше 0,08 М в системе (A_1) и больше 0,02 М (A_2), кривые зависимостей скоростей реакции от концентрации субстрата-окислителя выходят на плато, т.е. порядок реакции становится близким к нулю, что полностью соответствует схеме Михаэлиса-Ментен [25].

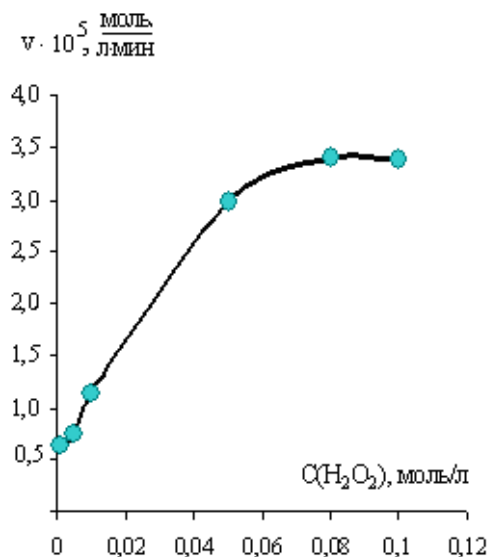


Рис. 1. Зависимость скорости пероксидазного окисления фенола от концентрации субстрата окислителя. $C(HRP) = 1 \cdot 10^{-7}$ М (A_1)

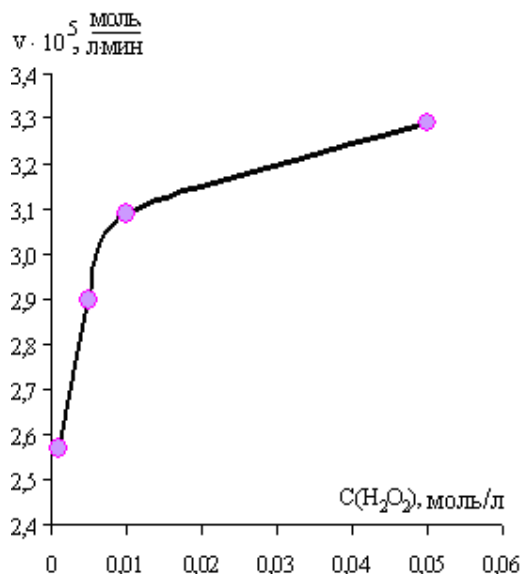


Рис. 2. Зависимость скорости пероксидазного окисления фенола от концентрации субстрата окислителя. $C(HRP) = 1 \cdot 10^{-6}$ М (A_2)

В системе (A_2) не удалось достоверно зафиксировать остаточные концентрации фенола по истечении выбранного времени экспозиции из-за высокой активности фермента для концентраций пероксида водорода выше $8 \cdot 10^{-2}$ М. Поэтому, для дальнейшей работы по созданию калибровочной зависимости активности фермента по фенолу от его концентрации в системе, рабочей концентрацией пероксида водорода выбрано $5 \cdot 10^{-2}$ М, а рабочий диапазон концентрации фермента $1 \cdot 10^{-7}$ – $1 \cdot 10^{-6}$ М. Правильность выбора рабочих концентраций реагентов, для определения начальных скоростей пероксидазного окисления фенола, подтверждается данными эксперимента, приведёнными на (рис. 3), где наблюдается линейное возрастание скорости реакции, с увеличением концентрации субстрата-восстановителя, что полностью соответствует начальному участку кинетической зависимости по схеме Михаэлиса-Ментен, первому порядку реакции.

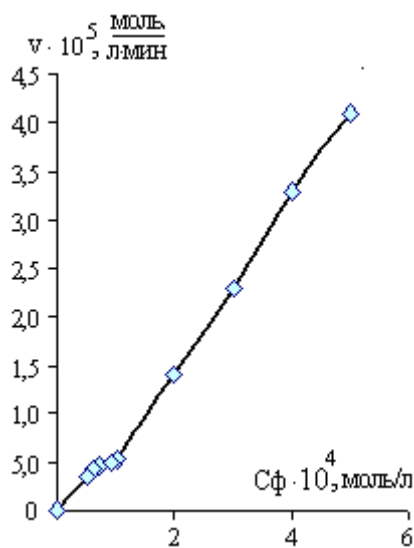


Рис. 3. Зависимость скорости реакции пероксидазного окисления фенола от концентрации субстрата. ($C(\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}) = 5 \cdot 10^{-5}$ – $5 \cdot 10^{-4}$ М; $C(\text{H}_2\text{O}_2) = 5 \cdot 10^{-2}$ М; $C(\text{HRP}) = 1 \cdot 10^{-7}$ М; $\tau = 10$ мин, $\text{pH} = 7$).

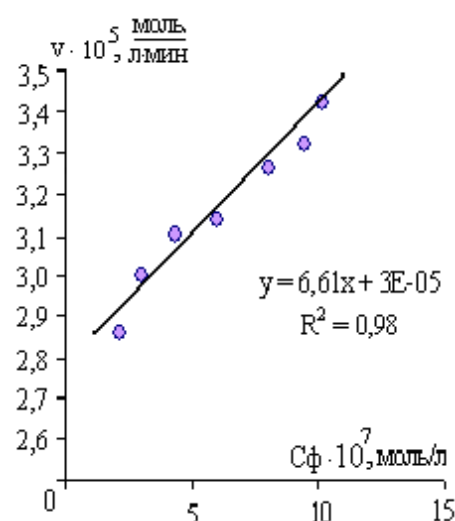


Рис. 4. Зависимость начальных скоростей пероксидазного окисления фенола от концентрации фермента (HRP) (системы $A_{1,2}$)

Следовательно, для определения активности исследуемого фермента по начальным скоростям пероксидазного окисления фенола оптимально использовать системы следующего состава: $C(\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}) = 5 \cdot 10^{-5}$ – $5 \cdot 10^{-4}$ М; $C(\text{H}_2\text{O}_2) = 5 \cdot 10^{-2}$ М; $C(\text{HRP}) = 1 \cdot 10^{-7}$ М; $\text{pH} = 7$, $\tau = 10$ мин. Варьирование в окислительных системах (А) концентрации фермента в рабочем диапазоне позволило определить его удельную активность по начальным скоростям окисления фенола. В результате была получена классическая линейная зависимость, представленная на (рис.4.), которую можно использовать как калибровочную для определения активности препаратов с

пероксидазной активностью, в том числе ферментов, выделенных из растительного сырья без дополнительной очистки. Средние расчетные значения пероксидазной активности фермента-стандарта по фенолу приведены в табл. 1.

Таблица 1

**Средняя активность пероксидазы хрена очищенной (RZ 0.6) по фенолу
(система А)**

Молярная активность $\tilde{A}_c$, моль субстрата/моль фермента · 1 мин.	Удельная активность $\tilde{A}_m$, мкмоль субстрата/мг фермента · 1 мин, (е.а)	1 (МЕ), моль (п)/моль (ф)·мин *
$8 \cdot 10^6$	0,18	$1,3 \cdot 10^{-7}$

* Международная единица активности (МЕ или U) – количество фермента (моль), катализирующие превращение 1 мкмоль субстрата за 1 мин.

Таким образом, в системе (А), эффективная активность по фенолу 1 мг фермента составляет 0,18 е.а, что позволяет нам представить следующие виды калибровочных зависимостей, представленных на рис.5, 6.

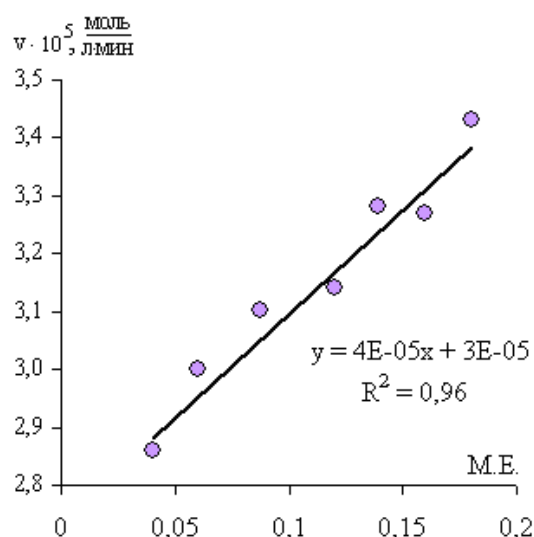


Рис. 5. Зависимость начальной скорости реакции пероксидазного окисления фенола от эффективной активности фермента (HRP).

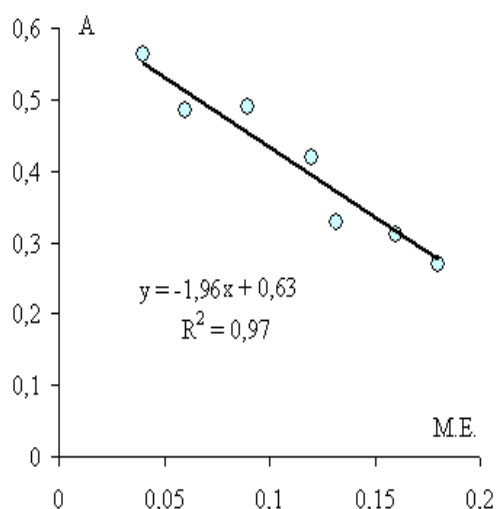


Рис. 6. Зависимость оптической плотности индикаторных систем от эффективной активности фермента (HRP).

Используя представленные зависимости при изучении скорости пероксидазного окисления фенола в присутствии ферментного препарата любого происхождения и

любой степени чистоты, достаточно будет либо определить в них начальные скорости реакции, либо только зафиксировать оптические плотности систем при определении остаточных концентраций фенола, а затем путем экстраполяции или расчетным методом определить эффективную активность исследуемого ферментного препарата по имеющимся зависимостям. Иначе активности ферментных препаратов, определенных различными методами, не будут иметь смысла при сопоставлении результатов.

Данный способ был применён для определений пероксидазной активности по фенолу и степени чистоты ферментного препарата, экстрагированного из корнеплода редьки черной (система (В)), где предварительно фотоколориметрическим методом по закону Бугера–Ламберта–Бера, при $\lambda_{(400\text{nm})}$ принимая, что $\varepsilon_{400} = 9,6 \cdot 10^4$ л/(моль·см) устанавливали концентрацию активных центров пероксидазы (Са.ц.) и рассчитывали ее теоретическую массу, считая, что $M(\text{пероксидазы редьки}) = 40000$ [24]. Также рассчитывали теоретическую пероксидазную активность фермента по фенолу, исходя из его условного содержания в системе, используя данные табл.1. В том же экстракте определяли массу белка биуретовым методом. Полученные данные сравнивали с результатами определения эффективной пероксидазной активности фермента по фенолу, предложенным нами способом калибровочной прямой. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2

Содержание и активность пероксидазы в фосфатно-буферном экстракте из корнеплода редьки черной, установленные различными методами (Vсистем = 0,05л)

Экспериментально определенные величины		Расчетные параметры	
Концентрация активных центров фермента	Са.ц.= $3 \cdot 10^{-6}$ моль/л.	Теоретическая масса фермента $m_{п.т}=6\text{мг}$	Теоретическая активность $A_t=1,1 \text{ М.Е.}$
Масса белка в пробе	$m_b=1,7\text{мг}$		
		Параметры определенные по калибровочным прямым рис. 5,6	
Конечная оптическая плотность окислительной системы с фенолом	$A=0,61$	Эффективная масса фермента $m_{п.эф.}=0,05\text{мг}$	Эффективная активность $A_{эф.}=0,009 \text{ М.Е.}$
Начальная скорость пероксидазного окисления фенола	$v=1,32 \cdot 10^{-5}$ $\frac{\text{МОЛЬ}}{\text{Л} \cdot \text{МИН}}$		

Из приведенных данных следует, что в неочищенном экстракте пероксидазы редьки черной, при λ_{400} поглощает не только гемм пероксидазы. Расчётные значения определяли по закону Бугера–Ламберта–Бера, из значений оптической плотности. Возможно, что высокая оптическая плотность системы обусловлена ее микрогетерогенностью и фиктивным характером светопоглощения, о чём свидетельствует чрезвычайно высокое расчетное значение количества фермента и его теоретическая активность по фенолу в МЕ, а также, масса фермента в более чем в три раза превышающая массу белка, определенного в том же экстракте биуретовым методом. Данные полученные при определении начальной скорости окисления фенола исследуемым экстрактом и данные интерпретированные с помощью калибровочных зависимостей (рис. 5, 6), по оптической плотности аналитических систем с остаточными концентрациями фенола, показывают, что реальной пероксидазной активностью обладает лишь 3 % от всех присутствующих в системе веществ белковой природы. Данный вывод вполне логичен, для неочищенного экстракта. Очевидно, что результаты, полученные предложенным нами методом определения пероксидазной активности выделенного неочищенного препарата с пероксидазной активностью, более объективны и унифицированы.

Для более строгого доказательства эффективности и универсальности предложенного метода определения активности было бы целесообразно построить калибровочные зависимости аналитического сигнала, характеризующего активность ферментного препарата с известной степенью чистоты, относительно других стандартных субстратов определения активности ферментов, например, для пероксидазы – 1,2,3-пирогалла, пирокатехина и другие.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. По результатам кинетических исследований были определены оптимальные условия и состав окислительных систем для определения начальных скоростей пероксидазного окисления фенола: $C(C_6H_5OH) = 5 \cdot 10^{-5} - 5 \cdot 10^{-4}$ М; $C(H_2O_2) = 5 \cdot 10^{-2}$ М; $C(HRP) = 1 \cdot 10^{-7}$ М; pH=7, $\tau=10$ мин.
2. Показано, что использование аналитической реакции фенола с 4-аминоантипирином позволяет использовать его как субстрат восстановитель для воспроизводимого оценивания пероксидазной активности очищенных ферментов и ферментных препаратов.
3. Предложен способ косвенного определения пероксидазной активности ферментных препаратов по фенолу, основанный на использовании калибровочных зависимостей, полученных при использовании ферментных препаратов с известной степенью очистки качестве стандарта.

Список литературы

1. Диксон М. Ферменты: Пер. с англ. / М. Диксон, Э. Уэбб. – М.: Мир, 1982. – Т. 1 – 392 с.
2. Лекарственные препараты из растительного сырья. Пероксидаза / Г. Ф. Давыдова, О. А. Ермаков, А. И. Панасенко // Химия растительного сырья. – 1998. – № 1. – С. 15–18.

3. Рогожин В. В. Роль индолил-3-уксусной кислоты в реакциях окисления быстро и медленно окисляемых субстратов пероксидазы / В. В. Рогожин, Т. В. Рогожина // Вестник Московского университета. – Серия 2. Химия. – 2004. – Т. 45, № 6. – С. 423–428.
4. Рогожина Т. В. Стационарная кинетика индивидуального и совместного окисления фенотиазинов в присутствии пероксидазы хрена / Т. В. Рогожина, В. В. Рогожин // Электронный журнал «ИССЛЕДОВАНО В РОССИИ». – 2002. – Т. 70. – С. 768–780.
5. Иммобилизация пероксидазы в поли-*n*-винилкапролактаме / И. И. Романовская, О. В. Осейчук, О. В. Севостьянов, [и др.] // Вісник ОНУ. – 2005. – Т. 10, Вып. 8. – С. 49–54.
6. Пестовский Ю. С. Иммобилизация пероксидазы хрена в гидрогеле и микрочастицах альгината кальция / Ю. С. Пестовский // Научный журнал КубГАУ. – 2013. – № 92, Т. 8. – С. 16.
7. Лягин И. В. Каталитические характеристики фермент-полиэлектrolитных комплексов на основе гексагистидинсодержащей органофосфатгидролазы / И. В. Лягин, Е. Н. Ефременко, А. В. Кабанов // Вестник Московского университета. – Серия 2. Химия. – 2014. – Т. 55, № 3. – С. 167–173.
8. Шеховцова Т. Н. Определение ртути (II) с использованием пероксидазы, ковалентно иммобилизованной на модифицированных силикагелях / Д. Л. Григорьева, И. А. Веселова, Т. Н. Шеховцова // Вестник Московского университета. – Серия 2. Химия. – 2003. – Т. 44, № 3. – С. 178–182.
9. Ермоленко Д. А. Изучение стабильности и сворачивания белков на примере убиквитина и пероксидазы: автореф. дисс. канд. биол. наук: 03.00.04 / Д. А. Ермоленко. – М., 2003. – 22 с.
10. Кудряшов А. П. Исследование стабильности препаратов иммобилизованной пероксидазы / А. П. Кудряшов // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: Междунар. науч. конф.; Десятый съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков, 19–21 июня 2012 г. Минск, Беларусь: сб. ст.: в 2 ч. Ч. – Минск: Изд. Центр БГУ. – 2012. – С. 42–45.
11. Catalytic activity and stability of glucose oxidase/horseradish peroxidase co-confined in macroporous silica foam / X. Cao, Y. Li, Z. Zhang, J. Yu, [et al] // The Royal Society of Chemistry. Analyst. – 2012. – Vol. 137. – P. 5785–5791.
12. Коновалова Е. В. Разработка количественного анализа серологических маркеров рака предстательной железы на гидрогелевых микрочипах: автореф. дисс. канд. физ.-мат. наук: 03.00.02 / Е. В. Коновалова. – М., 2006. – 23 с.
13. Кирейко А. В. Пероксидаза в полиэлектролитном комплексе и мицеллах поверхностно-активных веществ для определения ее субстратов и эффекторов в водно-органических средах: автореф. дисс. канд. хим. наук: 02.00.02 / А. В. Кирейко. – М., 2009. – 24 с.
14. Яблоцкий К. В. Новые аспекты применения нативной и иммобилизованной пероксидазы для определения ее ингибиторов и субстратов: автореф. дисс. канд. хим. наук: 02.00.02 / К. В. Яблоцкий. – М., 2010. – 25 с.
15. Виноградова Е. Н. Кинетические свойства и компонентный состав пероксидазы листьев *POPULUS DELTOIDES MARSH.* и *FRAXINUS LANCEOLATA BORKH.* В условиях техногенного загрязнения / Е. Н. Виноградова // Промышленная ботаника. – 2007. – Вып. 7. – С. 63–68.
16. Методы биохимического исследования растений / А. И. Ермаков [и др.]. – Л.: Агропромиздат, 1987. – 456 с.
17. Метелица Д. И. Иницирование и ингибирование свободнорадикальных процессов в биохимических пероксидазных системах (обзор) / Д. И. Метелица, Е. И. Карасёва // Прикладная биохимия и микробиология. – 2007. – Т. 43, №5. – С. 537–564.
18. Тихонов Б. Б. Биокатализатор для очистки сточных вод от фенола на основе иммобилизованной пероксидазы хрена / Б. Б. Тихонов, А. И. Сидоров, Э. М. Сульман // Катализ в промышленности. – 2007. – № 3. – С. 48–50.
19. Use of Enzymes to Remove Organic Micropollutants from Potable Water / B. Dussert, J. P. Duguet, J. Manem [et al] // Studies in Environmental Science. – 1986. – Vol. 29. – P. 655–662.
20. Большой практикум по микробиологии / Г. Л. Селибер. [и др.]. – Москва: Мир, 1962. – 492 с.
21. Ронин В. С. Руководство к практическим занятиям по методам клинических лабораторных исследований. / Ронин В. С., Старобинец Г. М. – М.: Мир, 1989. – 285 с.

22. Аналитическая химия: учебное пособие для студентов фармацевтических вузов и факультетов III–IV уровней аккредитации / В. В. Болотов [и др.]. – Харьков: НФАУ «Золотые страницы», 2001. – 305 с.
23. Лурье Ю. Ю., Химический анализ производственных сточных вод / Ю. Ю. Лурье, А. И. Рыбникова – М.: Химия, 1974. – 336 с.
24. Рогожин В. В. Peroксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов / В. В. Рогожин. – М.: ГИАРД, 2004. – 240 с.
25. Тарасевич Б. Н. ИК спектры основных классов органических соединений (Справочные материалы) / Б. Н. Тарасевич. – М.: МГУ им. М. В. Ломоносова, 2012. – 55 с.

ANALYSIS OF THE PROBLEM OF DETERMINING THE ACTIVITY OF ENZYME PREPARATIONS

Vyatkina O. V.¹, Bazhin V. U.¹, Alexandrova D. D.²

¹*V. I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russia*

²*Chemical-Biological Cluster of federal national independent educational establishment of the high education "St. Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics", St. Petersburg, Russia*

E-mail: oksana_vyatkina@list.ru

This article presents an analysis of the problem of representatives of research data on the determination of enzyme activity in relation to various substrates. We have shown many units of activity of enzyme preparations with various purifications used in modern studies. Also the impossibility of comparing units with each other. The limitations of the methods for determining the enzymatic activity with the highest substrate specificity of the enzyme are shown by the example of plant peroxidases. Phenol is a common ecotoxicant and is used as the main agent that reduces peroxidase. The problem of comparing the effectiveness of enzyme preparations with various degrees of purification is shown. Due to the impossibility of comparing unit activity. To solve this problem, a scheme was developed for determining the peroxidase activity of drugs by phenol as a reducing substrate and the optimal process parameters were indicated. Using the analytical interaction between phenol and 4-aminoantipyrine allows it to be used as a reducing agent for the reproducible assessment of the peroxidase activity of purified enzymes and enzyme preparations. A method for indirect determination of peroxidase activity of enzyme preparations by phenol based on the use of calibration dependencies is proposed. The following relationships were constructed in this study: 1. the dependence of the rate of phenol oxidation by peroxidase on the concentration of hydrogen peroxide; 2. the dependence of the rate of peroxidase oxidation of phenol on the initial concentration of the substrate; 3. The dependence of the initial rates of peroxidase oxidation of phenol on the concentration of the enzyme (HRP); 4. The dependence of the initial reaction rate of peroxidase oxidation of phenol on the effective activity of the enzyme (HRP); 5. The dependence of the optical density of indicator systems on the effective activity of the enzyme (HRP). The method for determining activity proposed in the study was tested to determine the activity of a crude enzyme extracted from black radish root. The difference

in the values of the activity of the crude enzyme calculated according to the constructed dependencies and the theoretical value of the total protein mass is shown. Features of using the described method are revealed, possible limits of applicability for extremely inactive enzymes are indicated, and theoretical solutions to the identified shortcomings are proposed.

Keywords: peroxidase, enzyme activity, phenol, schedule of calibration.

References

1. Dixon M., Webb E., *Enzymes*: Trans. from English, 392 p. (Mir, Moscow, 1982). (in Russ.)
2. Davydova G. F., Ermakov O. A., Panasenko A. I., Medicines from plant materials. Peroxidase. *Chemistry of plant raw materials*, **1**, 15, (1998).
3. Rogozhin V. V., Rogozhina T. V., The role of indolyl-3-acetic acid in the oxidation reactions of rapidly and slowly oxidized peroxidase substrates, *University Physics Bulletin*, **45** (6), 423, (2004).
4. Rogozhina T. V., Rogozhin V. V., Stationary kinetics of individual and combined oxidation of phenothiazines in the presence of horseradish peroxidase, e-print "RESEARCHED IN RUSSIA", **70**, 768, (2002).
5. Romanovskaya I. I., Oseychuk O. V., Sevostyanov O. V., Immobilization of peroxidase in poly – n-vinylcaprolactam, *Visnik ONU*, **10**, 49, (2005).
6. Pestovsky Y. S., Immobilization of horseradish peroxidase in the hydrogel and microparticles of calcium alginate, *Scientific journal KubSAU*, **8**, 8, (2013).
7. Lyagin I. V., Efremenko E. N., Kabanov A. V., Catalytic characteristics of enzyme-polyelectrolyte complexes based on hexahistidine-containing organophosphate, *Moscow University Physics Bulletin*, **55**, 167, (2014).
8. Shekhovtsova T. N., Grigoryeva D. L., Veselova I. A., Determination of mercury (II) using peroxidase covalently immobilized on modified silica, *Moscow University Physics Bulletin*, **44**, 178, (2003).
9. Ermolenko D. A., The study of stability and folding of proteins on the example of ubiquitin and peroxidase: abstract. diss. Cand. biol. Sciences: 03.00.04, 22 p., (2003).
10. Kudryashov A. P., Investigation of the stability of immobilized peroxidase preparations, *Intern. scientific conf.; Tenth Congress of the Belarusian Public Association of Photobiologists and Biophysicists*, (BGU, Minsk, 2012), 42.
11. Cao X., Li Y., Zhang Z., Yu J., Catalytic activity and stability of glucose oxidase/horseradish peroxidase co-confined in macroporous silica foam, *The Royal Society of Chemistry. Analyst*, **137**, 5785, (2012).
12. Konovalova E. V., Development of a quantitative analysis of serological markers of prostate cancer on hydrogel microarrays: author. diss. Cand. physical mat. Sciences: 03.00.02, 23 p., (2006).
13. Kireiko A. V., Peroxidase in the polyelectrolyte complex and micelles of surface-active substances to determine its substrates and effectors in aqueous-organic media: abstract. diss. Cand. Chem. Sciences: 02.00.02, 24 (2009).
14. Yablotsky K. V., New aspects of the use of native and immobilized peroxidase to determine its inhibitors and substrates: abstract. diss. Cand. Chem. Sciences: 02.00.02, 25 p., (2010).
15. Vinogradova E. N., Kinetic properties and component composition of leaf peroxidase *POPULUS DELTOIDES MARSH.* and *FRAXINUS LANCEOLATA BORKH.* In conditions of technogenic pollution, *Industrial botany*, **7**, 63, (2007).
16. Ermakov A. I., Methods of biochemical research of plants, *Agropromizdat*, **1**, 456, (1987).
17. Metelitsa D. I., Karaseva E. I. Initiation and inhibition of free radical processes in biochemical peroxidase systems (review), *Applied Biochemistry and Microbiology*, **43**, 537, (2007).
18. Tikhonov B. B., Sidorov A. I., Sulman E. M., Biocatalyst for wastewater treatment from phenol based on immobilized horseradish peroxidase, *Catalysis in industry*, **3**, 48, (2007).
19. Dussert B., Duguet J. P., Manem J., Use of Enzymes to Remove Organic Micropollutants from Potable, *Studies in Environmental Science*, **29**, 655, (1986).
20. Seliber G. L., *A large workshop on microbiology*, p. 492, (Mir, Moscow, 1962). (in Russ.)
21. Ronin V. S., Starobinets G. M., *Guide to practical exercises on clinical laboratory research methods*, p. 285, (Mir, Moscow, 1989). (in Russ.)

22. Bolotov V. V., *Analytical chemistry: a textbook for students of pharmaceutical universities and faculties of III – IV levels of accreditation*, 305 p., (Golden Pages, Kharkov, 2001). (in Russ.)
23. Lurie Y. Y., Rybnikova A. I., *Chemical analysis of industrial wastewater*,. 336 p, (Chemistry, Moscow, 1974). (in Russ.)
24. Rogozhin V. V., *Peroxidase as a component of the antioxidant system of living organisms*, p. 240, (GIARD, Moscow, 2004). (in Russ.)
25. Tarasevich B. N., *IR spectra of the main classes of organic compounds* (Reference materials), 55 p., (State University. M. V. Lomonosova, Moscow, 2012). (in Russ.)

УДК 553.635.1:666.913.2

ВЛИЯНИЕ ФОСФАТОВ НАТРИЯ НА ПРОЦЕСС ОТВЕРЖДЕНИЯ ГИПСА

Гришковец В. И.¹, Норкин А. С.¹, Яковишин Л. А.², Корж Е. Н.²

¹*Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского», Симферополь, Республика Крым, Россия*

²*ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет», Севастополь, Республика Крым, Россия*

E-mail: vladgri@ukr.net

Изучено влияние фосфата натрия, гидрофосфатов натрия, калия, аммония и дигидрофосфата натрия на процесс отверждения гипса. Исследована концентрационная зависимость ингибирующего действия каждой из солей в диапазоне концентраций 0,1–0,0031 М. Показано, что наибольшей ингибирующей активностью обладает тризамещенный фосфат натрия. Дизамещенные фосфаты натрия, калия и аммония обладают сравнимой с фосфатом натрия активностью, а дигидрофосфат натрия практически не проявляет ингибирующую активность. Практическое использование исследованных фосфатов наиболее эффективно в диапазоне концентраций 0,125–0,5 М.

Ключевые слова: гипс, ингибирование отверждения, фосфат натрия, гидрофосфат натрия, дигидрофосфат натрия, гидрофосфаты калия и аммония.

ВВЕДЕНИЕ

Гипсовые вяжущие материалы широко применяются в строительной индустрии [1–4] и одной из актуальных задач является улучшения условий их формирования. В строительстве специальные модифицирующие добавки, замедляющие скорость отверждения гипсовых вяжущих веществ пользуются большим спросом. Поэтому изучение различных модификаторов при получении гипсовых вяжущих веществ представляет актуальную задачу и требует детального исследования.

Целью настоящей работы явилось изучение неорганических фосфатов в качестве регуляторов процесса отверждения гипса, а именно сравнительная оценка ингибирующего действия фосфатов натрия различной степени замещения, изучение зависимости ингибирующего действия от концентрации каждого из фосфатов, сравнение ингибирующего действия гидрофосфата натрия с гидрофосфатами калия и аммония и сопоставление ингибирующей активности изученных фосфатов с цитратом натрия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовались вещества: гипс строительный Г5, гидрофосфат натрия додекагидрат ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) и натрий фосфорнокислый однозамещенный дигидрат (NaH_2PO_4), фосфат натрия (Na_3PO_4) и цитрат натрия ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5,5\text{H}_2\text{O}$), гидрофосфат калия тригидрат ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), гидрофосфат аммония ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$).

В ходе работы использовали исходные 0,1 М растворы фосфатных солей. Путем последовательного разбавления дистиллированной водой были получены растворы следующих молярностей: 0,05; 0,025; 0,0125; 0,0062; 0,0031.

Для определения времени начала и окончания отверждения брали навески гипса по 2,0 г, к которым добавляли по 1,2 мл исследуемых растворов каждого из фосфатов в указанных выше концентрациях. Смеси перемешивали в ступке с помощью пестика в течение 10 с. Получившуюся гипсовую массу переносили на подложку и фиксировали время начала и окончания отверждения образца. Момент помутнения глянцевой поверхности гипсовой смеси отмечали как начало процесса отверждения. Время окончательного отверждения определялось в момент, когда образец перестает деформироваться при надавливании стеклянной палочкой.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве объектов исследования были взяты различно замещенные фосфаты натрия – а именно тризамещенный фосфат натрия, гидрофосфат натрия, дигидрофосфат натрия, а также дигидрофосфаты калия и аммония. В качестве образца для сравнения активности использовался ранее исследованный в нашей лаборатории цитрат натрия [5].

Все исследованные фосфаты натрия различной степени замещения в той или иной мере проявили замедляющее действие на процесс отверждения гипса. Наиболее активным из исследованных соединений оказался тризамещенный фосфат натрия. Как и следовало ожидать, замедляющая активность возрастает с увеличением концентрации фосфата вплоть до исследованной концентрации 0,1 М. Растворы с большей концентрацией не исследовались, так как даже при концентрации 0,1 М отмечено ухудшение прочностных характеристик полученных образцов, которые рассыпаются при легком изгибе. Результаты эксперимента приведены в таблице 1.

Таблица 1
Ингибирующее действие фосфатов натрия на процесс отверждения гипса

С (моль/л)	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇		Na ₃ PO ₄		Na ₂ HPO ₄		NaH ₂ PO ₄	
	Нач.	Оконч.	Нач.	Оконч.	Нач.	Оконч.	Нач.	Оконч.
0,1	100	270	70	120	1.0	15	4	9
0,05	90	240	39	76	10	17	5	12
0,025	80	200	18	42	19	26	4	12
0,0125	70	140	7	20	28	36	4	12
0,0063	50	80	4	10	14	27	3	10
0,0031	30	40	3	9	5	16	3.5	13

Из полученных данных видно, что при концентрации фосфата натрия 0,05 М время начала отверждения составляет около 40 минут и время полного затвердевания – около 80 минут при сохранении механической прочности,

свойственной образцам гипса, полученным с использованием воды без добавок солей. С уменьшением концентрации фосфата натрия время начала и окончания схватывания также уменьшались, однако заметный эффект наблюдался даже при концентрации 0,0125 М. Графически результаты представлены на рис. 1 и 2 (кривые красного цвета). В то время как время начала затвердения для гипса составило около 4 минут, а окончательное затвердение наблюдалось через 9 минут.

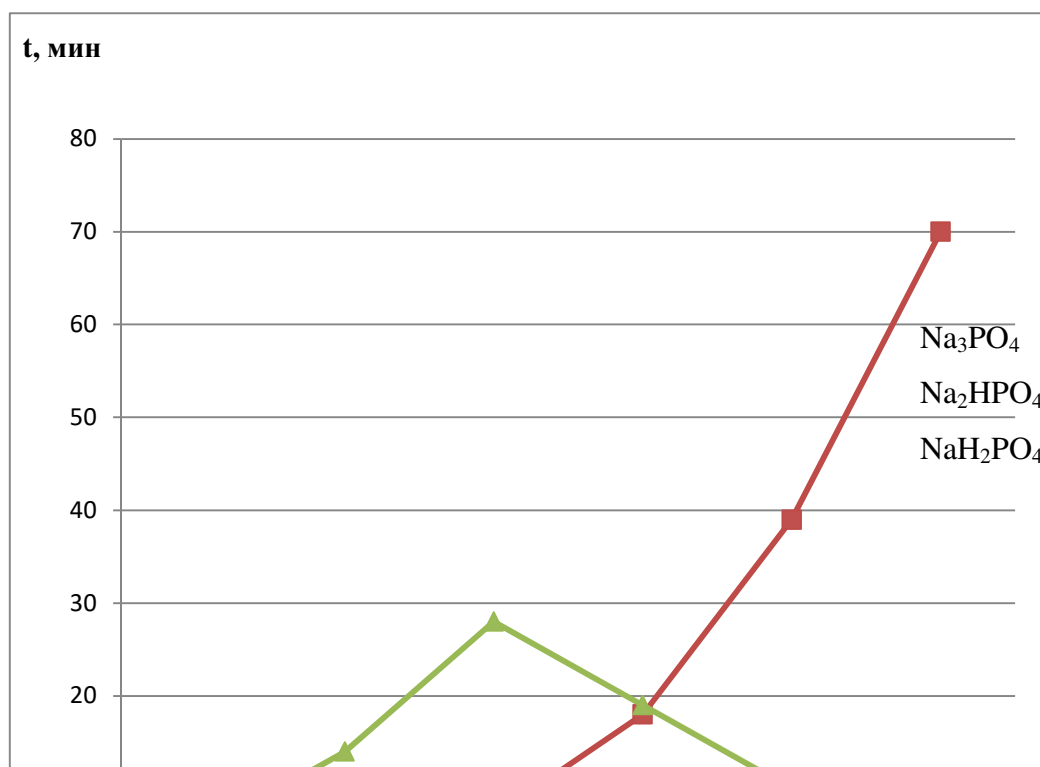


Рис. 1. Зависимость времени начала отверждения гипса от концентрации солей.

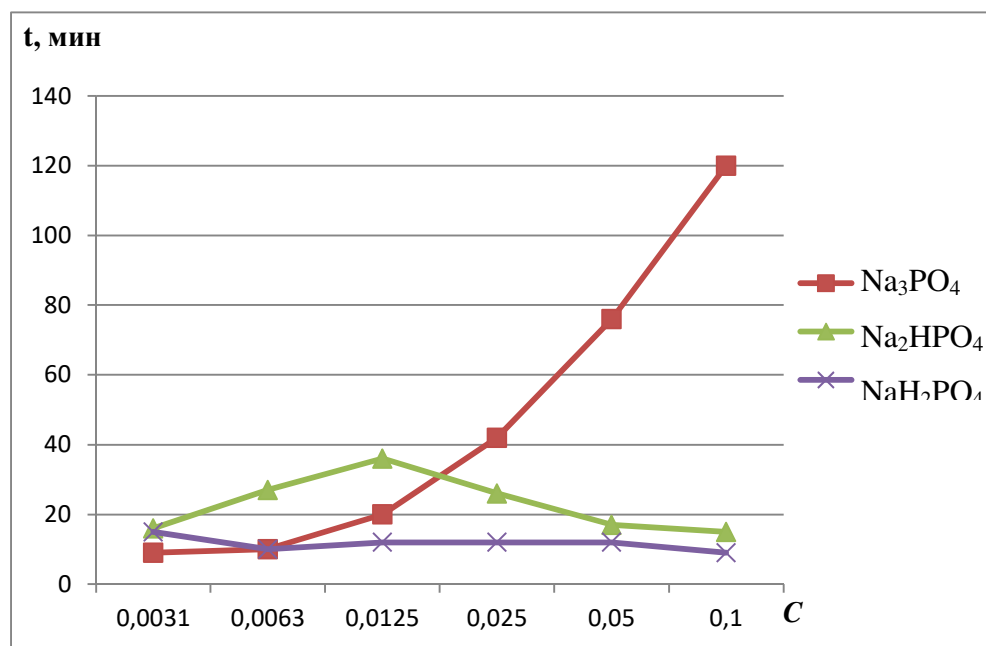


Рис. 2. Зависимость времени окончания отверждения гипса от концентрации солей.

В противоположность этому монозамещенный фосфат натрия (дигидрофосфат) проявил очень слабую ингибирующую активность как при высоких, так и при низких концентрациях. Время начала затвердевания составило около 4 минут, а окончания – около 12 минут. Результаты приведены в таблице 1 и на рис. 1 и 2.

Разнонаправленные результаты были получены для дизамещенного фосфата (гидрофосфата) натрия. Для исходной концентрации 0,1 М было отмечено даже существенное ускоряющее действие на процесс схватывания гипса, а именно время начала отверждения составило лишь 1 минуту (против 4 минут для дистиллированной воды), а время окончания практически не изменилось по сравнению с водой. При меньших концентрациях характер действия в принципе изменился на ингибирование процесса отверждения, причем максимум ингибирующего действия хорошо выражен при концентрации 0,0125 М, и ингибирующее действие значительно – около 30 минут до начала отверждения и около 40 минут до полного отверждения. Результаты приведены в таблице 1 и рисунках 1 и 2. В сравнении с фосфатом натрия гидрофосфат лишь немного уступает в ингибирующей активности.

Представилось интересным изучить и гидрофосфаты калия и аммония и сравнить полученные результаты с данными для гидрофосфата натрия. Было установлено, что для гидрофосфатов калия и аммония явный ускоряющий эффект не наблюдается, однако на концентрационных зависимостях (рисунок 2) также прослеживаются максимумы ингибирующей активности, однако при несколько иных (более высоких) концентрациях, чем для гидрофосфата натрия. Очевидно, что

и здесь с повышением концентрации начинает проявляться эффект ускорения процесса гидратации, однако он не превышает эффект замедления в исследуемом диапазоне концентраций.

Таблица 2
Ингибирующее действие гидрофосфатов натрия калия и аммония на процесс отверждения гипса

С (моль/л)	Na ₂ HPO ₄		K ₂ HPO ₄		(NH ₄) ₂ HPO ₄	
	Нач.	Оконч.	Нач.	Оконч.	Нач.	Оконч.
0,1	1.0	15	13	15	11	13
0,05	10	17	24	29	21	26
0,025	19	26	17	27	32	36
0,0125	28	36	9	21	17	29
0,0063	14	27	10	23	9	21
0,0031	5	16	4	16	3	14

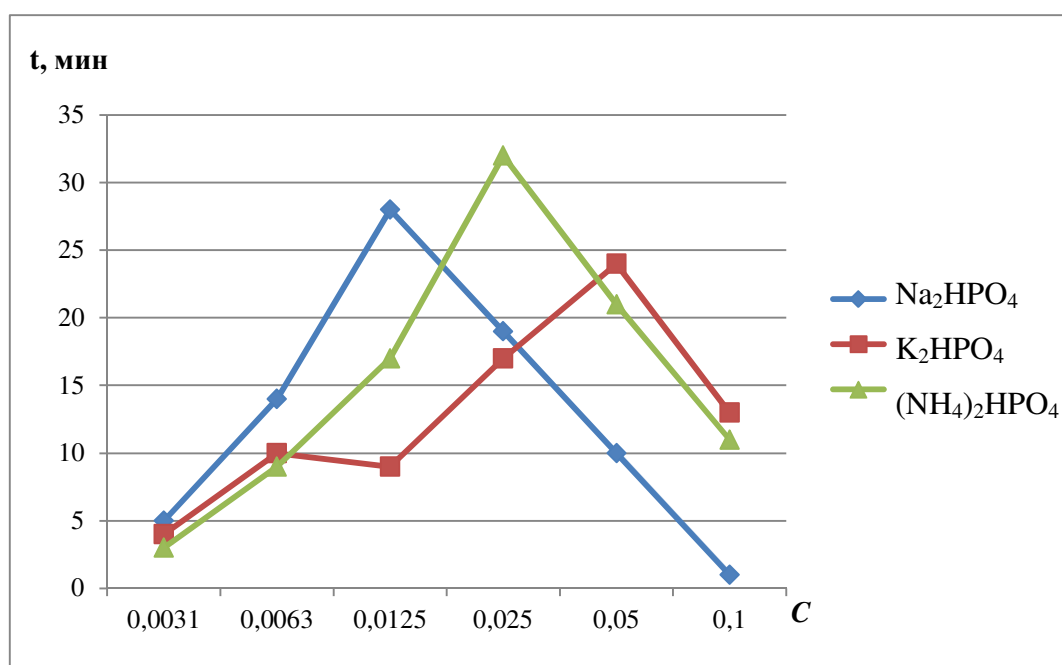


Рис. 3. Зависимость времени начала отверждения гипса от концентрации гидрофосфатов.

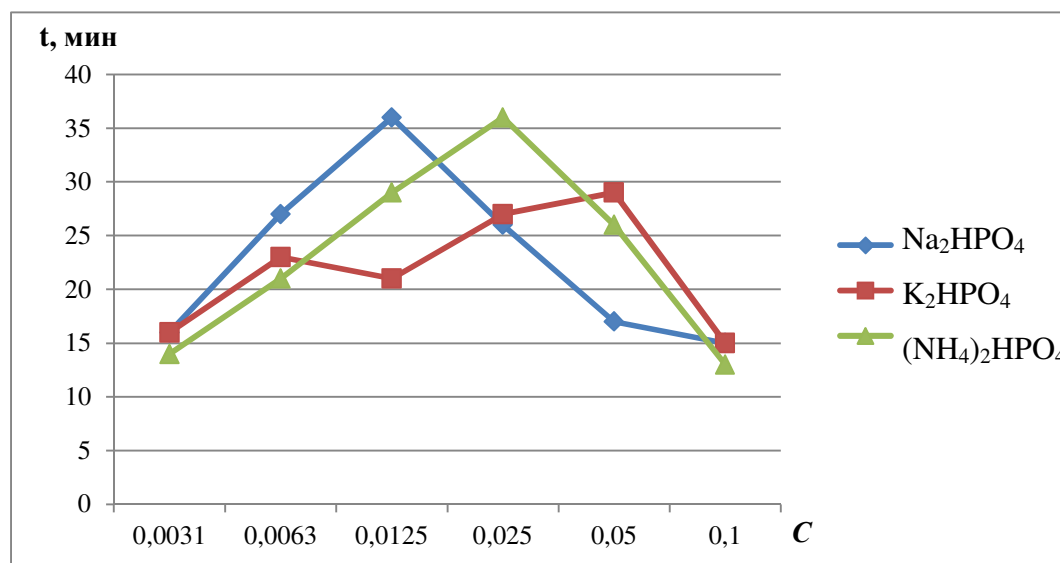


Рис. 4. Зависимость времени окончания отверждения гипса от концентрации гидрофосфатов.

Наблюдаемые эффекты ингибирования и ускорения, видимо, связаны с разными параллельно протекающими процессами, природа которых пока не вполне понятна. Возможно, что ускоряющее действие фосфатов в высоких концентрациях проявляется так же и по той же причине, как и у нейтральных солей (хлориды, нитраты, сульфаты щелочных металлов), ускоряющий эффект которых известен и описан в литературе [1].

Проведен сравнительный анализ полученных результатов по ингибирующему действию фосфатов с ранее изученными цитратами щелочных металлов и, в частности, с цитратом натрия, повторенные результаты по которому также приведены в таблице 1. Видно, что цитрат натрия проявляет определенно большую активность даже в сравнении с три- и дизамещенными фосфатами. Однако и наблюдаемый для изученных соединений эффект представляет значительный практический интерес, так как коммерческая стоимость фосфатов натрия очень низка даже в сравнении с цитратом натрия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Изучено влияние фосфата натрия, гидрофосфатов натрия, калия и аммония, а также дигидрофосфата натрия на процесс отверждения гипса.
2. Исследована концентрационная зависимость ингибирующего действия каждой из солей в диапазоне концентраций 0,1–0,0031 М.
3. Показано, что наибольшей ингибирующей активностью обладает тризамещенный фосфат натрия. Дизамещенные фосфаты натрия, калия и

аммония обладают сравнимой с фосфатом натрия активностью, а дигидрофосфат натрия практически не проявляет ингибирующую активность.

4. Практическое использование исследованных фосфатов наиболее эффективно в диапазоне концентраций 0,125–0,5 М.

Список литературы

1. Бутт Ю. М. Химическая технология вяжущих материалов: учебник для вузов / Ю. М. Бутт, М. М. Сычев, В. В. Тимашев. – М.: Высшая школа, 1980. – 472 с.
2. Попов К. Н. Строительные материалы и изделия: учебник для вузов / К. Н. Попов, М. Б. Каддо. – М.: Высшая школа, 2005. – 438 с.
3. Пашенко А. А. Вяжущие материалы / А. А. Пашенко, В. П. Сербин, Е. А. Старчевская – Киев: Вища школа, 1985. – 440 с.
4. Сулименко Л. М. Технология минеральных вяжущих материалов и изделий на их основе: учебник для вузов / Л. М. Сулименко. – М.: Высшая школа, 2005. – 334 с.
5. Гришковец В. И. Влияние солей лимонной кислоты на процесс отверждения гипса. / В. И. Гришковец, Л. А. Яковишин, Е. Н. Корж // Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского. Биология, химия. – 2016. – Т. 2 (68), № 3. – С. 83–89.

THE EFFECT OF SODIUM PHOSPHATES IN THE CURING GYPSUM PROCESS

Grishkovets V. I.¹, Norkin A. S.¹, Yakovishin L. A.², Korzh E. N.²

¹*V. I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russia*

²*Sevastopol State University, Sevastopol, Russia*

E-mail: vladgri@ukr.net

The aim of this work was to study inorganic phosphates as regulators of gypsum curing process. Various substituted sodium phosphates – trisubstituted sodium phosphate, sodium hydrophosphate, sodium dihydrophosphate, potassium and ammonium dihydrophosphates were taken as objects of the study.

The most active of the studied compounds was trisubstituted sodium phosphate. As expected, the inhibitory activity increases with increasing phosphate concentration up to the studied concentration of 0.1 M. In contrast, monosubstituted sodium phosphate (dihydrophosphate) showed very weak inhibitory activity at both high and low concentrations. Interesting results were obtained for disubstituted (hydrophosphate) sodium phosphate. In the initial concentration of 0.1 M, even a significant accelerating effect on the process of gypsum curing was observed. At lower concentrations, the nature of the action in principle changed to inhibition of the curing process, and the maximum inhibitory effect is well expressed at a concentration of 0.0125 M and the inhibitory effect is significant in comparison with sodium phosphate, hydrophosphate is only slightly inferior in inhibitory activity.

It was interesting to study potassium and ammonium hydrophosphates and compare the results with the data for sodium hydrophosphate. It was found that for potassium and ammonium hydrophosphates, a clear accelerating effect was not detected, but the

concentration dependences also show the maximum inhibitory activity, but at slightly different (higher) concentrations than for sodium hydrophosphate.

It was interesting to compare the results obtained on the inhibitory effect of phosphates with sodium citrate. The latter is definitely more active even in comparison with tri- and disubstituted phosphates, but the effect observed for the studied compounds is of considerable practical interest, especially since the commercial cost of sodium phosphates is very low even in comparison with sodium citrate.

Keywords: gypsum, the inhibition of curing, sodium phosphate, sodium hydrogen phosphate, sodium dihydrogen phosphate, potassium and ammonium hydrogen phosphates.

References

1. Butt Yu. M., Sychev M. M., Tamashev V. V., *Chemical technology of knitting materials: the textbook for high schools*, 472 p. (High school, Moscow, 1980). (In Russ.)
2. Popov K. N., Kaddo M. B., *Building materials and products: a textbook for high schools*, 438 p. (High school, Moscow, 2005). (In Russ.)
3. Paschenko A. A., Serbin V. P., Starchevskaya E. A., *Cementing materials*, 440 p. (High school, Kiev, 1985). (In Russ.)
4. Sulimenko L. M., *The technology of mineral binding materials and products based on them: a textbook for high schools*, 334 p. (High school, Moscow, 2005). (In Russ.)
5. Grishkovets V. I., Yakovishin L. A., Korzh E. N., Effect of citric acid salts on the process of gypsum curing, *Scientific Notes of V.I. Vernadsky Crimean Federal University. Biology. Chemistry*, **2** (3), 83 (2016). (in Russ.).

УДК 546.41:54.05

СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНО-МОРФОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КАЛЬЦИЙ-ДЕФИЦИТНОГО КАРБОНАТСОДЕРЖАЩЕГО ГИДРОКСИАПАТИТА В ПРИСУТСТВИИ ЦИТРАТ-ИОНОВ

Трубицын М. А., Хоанг Вьет Хунг, Фурда Л. В.

*Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия
E-mail: hung.hoangviet191290@gmail.com*

В настоящей работе методом осаждения из водных растворов были получены образцы кальций-дефицитного карбонатсодержащего гидроксиапатита ($\text{Ca}_d\text{-КГАП}$) с различными молярными соотношениями $\text{Ca}/(\text{PO}_4^{3-} + \text{CO}_3^{2-})$. Синтез осуществляли в присутствии цитрат-ионов с целью ингибирования роста и предотвращения агрегации кристаллов. Полученные образцы были исследованы различными физико-химическими методами анализа. Результаты рентгенофазового анализа (РФА) показали, что все синтезированные материалы являются однофазными и могут быть идентифицированы как модификация ГАП. Средний размер кристаллитов $\text{Ca}_d\text{-КГАП}$ и КГАП составляет 17,21 – 23,4 нм. Методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) установлено, что для всех исследуемых материалов частицы имеют игольчатую форму. Длина и ширина кристаллов составляет 40 – 65 нм и 3,0 – 6,5 нм соответственно. После высушивания синтезированных гидрогелей, образцы $\text{Ca}_d\text{-КГАП}$ и КГАП представляют собой порошки белого цвета. Результаты анализа методом растровой электронной микроскопии (РЭМ) показали, что полученные нанокристаллы агрегируют в более крупные частицы размером 1–5 мкм. Методом низкотемпературной адсорбции-десорбции азота (БЭТ) выявлено, что исследуемые материалы обладают развитой удельной поверхностью.

Ключевые слова: гидроксиапатит, кальций-дефицитный, карбонатсодержащий, биоматериал, цитрат-ионы, фазовый состав, размер частиц.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время биоматериалы на основе синтетического гидроксиапатита ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, ГАП) в силу химического сходства с костной тканью находят широкое применение в медицинской практике (стоматологии, ортопедии, хирургии) в виде керамики, цемента, композитов, покрытий и т.д. [1–3].

Известно, что минеральный состав костей человека и животных не отвечает стехиометрическому ГАП и может рассматриваться как кальций-дефицитный карбонатсодержащий гидроксиапатит с молярным соотношением $\text{Ca}/(\text{PO}_4^{3-} + \text{CO}_3^{2-}) < 1,67$ [$\text{Ca}_{10-d}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x-y}(\text{CO}_3)_y(\text{OH})_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ca}_d\text{-КГАП}$], который, как показано во многих работах [4–6], обладает лучшей биоактивностью и биорезорбируемостью по сравнению с немодифицированным гидроксиапатитом. Как следствие, в последние годы $\text{Ca}_d\text{-КГАП}$ весьма эффективно используется в качестве биосовместимых имплантатов.

На данный момент известны различные методы синтеза нанокристаллического $\text{Ca}_d\text{-КГАП}$ из которых выделяют: мокрый (осаждение из растворов) [7], сухой

(твердофазный синтез) [8], гидротермальный [9] и золь-гель [10]. Методика и параметры синтеза в значительной степени оказывают влияние не только на фазовый состав, термическую стабильность, но и на морфологию и размер частиц синтезируемых материалов. Известно, что цитрат-ионы являются модификаторами кристаллических структур и способны ингибировать рост и агрегацию кристаллов [11]. Поэтому разработка способа получения стабильного монофазного нанокристаллического $\text{Ca}_d\text{-КГАП}$ является актуальным направлением исследования.

Целью настоящей работы является разработка способа получения $\text{Ca}_d\text{-КГАП}$ в присутствии цитрат-ионов, а также изучение его морфологии и физико-химических характеристик.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В данной работе были получены образцы $\text{Ca}_d\text{-КГАП}$ с мольными соотношениями $\text{Ca}/(\text{PO}_4^{3-} + \text{CO}_3^{2-})$ - 1,33; 1,50; 1,58; а также 1,67 в качестве сравнения (индексы образцов – $\text{Ca}_d\text{-КГАП}$ 1,33; $\text{Ca}_d\text{-КГАП}$ 1,50; $\text{Ca}_d\text{-КГАП}$ 1,58; КГАП 1,67 соответственно). Синтез образцов $\text{Ca}_d\text{-КГАП}$ и КГАП осуществляли по авторской методике осаждением из водного раствора следующих реагентов: хлорида кальция (CaCl_2), гидрокарбоната натрия (NaHCO_3) и дигидроортофосфата натрия (NaH_2PO_4). В качестве источника цитрат-ионов в данную систему вводили лимонную кислоту. Синтез проводили при интенсивном перемешивании с помощью верхнеприводной мешалки в течение 20 минут при комнатной температуре и pH на уровне 10,5. Затем реакционную смесь постепенно нагревали до 80°C и выдерживали в температурном интервале 80°C – 90°C в течение 4 ч. Полученный осадок отфильтровывали, промывали дистиллированной водой и сушили при 110°C до постоянной массы. Далее полученные образцы измельчали в фарфоровой ступке до порошкообразного состояния и просеивали через сито с отверстиями диаметром 0,25 мм.

Количественное определение кальция проводили комплексонометрическим титрованием. Содержание карбонатов в высушенных образцах $\text{Ca}_d\text{-КГАП}$ и КГАП определяли алкаиметрическим методом [12]. Для количественного определения фосфора в полученных материалах использовали спектрофотометрический метод на приборе LEKI SS1104 при длине волны $\lambda=420$ [13]. Все синтезированные образцы имели фактическое мольное соотношение $\text{Ca}/(\text{PO}_4^{3-} + \text{CO}_3^{2-})$ близкое к проектному.

Рентгенофазовый анализ полученных порошков $\text{Ca}_d\text{-КГАП}$ и КГАП проводили на дифрактометре Rigaku Ultima IV с излучением CuK_α при $\lambda=1.54178\text{\AA}$ в интервале $2\theta=5-85^\circ$. Результаты обрабатывали с использованием базы данных ICDD, PDF 2008 и программы PDXL Qualitative Analysis. Размер первичных кристаллитов рассчитывали по формуле Шеррера [14].

Морфологию поверхности полученных материалов исследовали при помощи просвечивающего электронного микроскопа JEM-2100 фирмы «JEOL», Япония. Ускоряющее напряжение электронной пушки составило 200 кВ, а материал катода - монокристалл LaB_6 . Электронные фотографии в просвечивающем режиме получены при увеличении $\times 200.000$.

Особенности структуры порошков $\text{Ca}_d\text{-КГАП}$ и КГАП изучали с помощью растрового электронного микроскопа Quanta 200 3D. Ускоряющее напряжение

электронной пушки составило 5 кВ. Для регистрации изображения материалов использовали CCD камеру с применением преобразования Хуга (Hough). Увеличение изображения до $\times 20.000$.

Определение удельной поверхности ($S_{уд.}$), объема и среднего размера пор исследуемых материалов проводили методом Брюнера-Эммета-Теллера (БЭТ) при температуре 77К на автоматизированной сорбционной установке TriStar II 3020 (фирма «Micromeritics», США). Величина удельной поверхности рассчитывалась по изотерме низкотемпературной адсорбции паров азота по одноточечному методу БЭТ в точке $P/P_0 = 0,3189$, объем пор при $P/P_0 = 0,980666$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты РФА подтвердили, что синтезированные материалы являются однофазными (рис. 1) и могут быть идентифицированы как модификация ГАП, т.е. принадлежат к той же пространственной группе, что и гидроксиапатит – гексагональная сингония $R\bar{6}_3/m$. Характеристики образцов представлены в таблице 1.

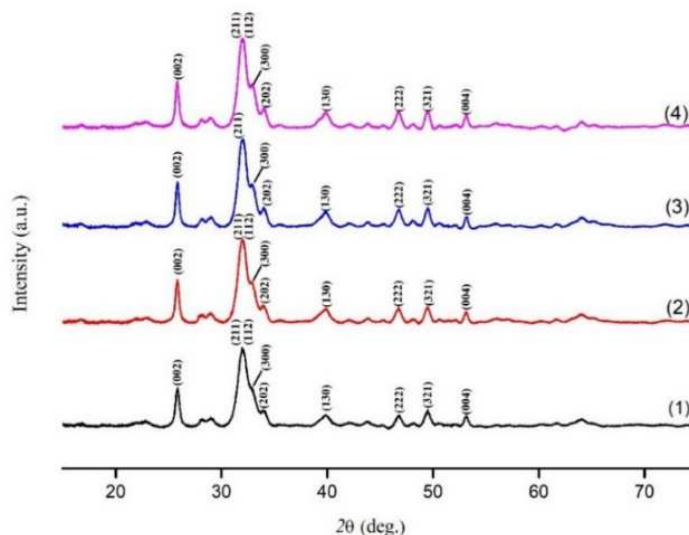


Рис. 1. Рентгеновские порошковые дифрактограммы полученных образцов: (1) – $\text{Ca}_d\text{-КГАП 1,33}$; (2) – $\text{Ca}_d\text{-КГАП 1,50}$; (3) – $\text{Ca}_d\text{-КГАП 1,58}$; (4) – КГАП 1,67 .

Расчеты по формуле Шеррера показали, что средний размер кристаллитов для $\text{Ca}_d\text{-КГАП}$ и КГАП составляет от 17,21 до 23,4 нм. Это согласуется с предположением, что цитрат-ионы в реакции могут ограничивать рост кристаллов ГАП в процессе их созревания. Для $\text{Ca}_d\text{-КГАП}$ при увеличении мольного соотношения $\text{Ca}/(\text{PO}_4^{3-} + \text{CO}_3^{2-})$ наблюдается тенденция к росту размера кристаллитов. По мере приближения значения мольного отношения к

стехиометрическому отмечается уменьшение параметров элементарной ячейки a , b , c в частности, и объема элементарной ячейки веществ в целом.

Таблица 1
Характеристики образцов Ca_d -КГАП и КГАП по данным РФА

Образец	Число фаз	Параметры элементарной ячейки, нм		Степень кристалличности, %	Средний размер кристаллитов, нм
		$a = b$	c		
Ca_d -КГАП 1,33	1	0,9404	0,6897	73,69	17,21
Ca_d -КГАП 1,50	1	0,9404	0,6889	91,16	19,92
Ca_d -КГАП 1,58	1	0,9390	0,6880	82,39	23,40
КГАП 1,67	1	0,9380	0,6875	89,84	18,50

Метод просвечивающей электронной микроскопии был использован для изучения морфологии полученных материалов и оценки размеров частиц после синтеза. Установлено, что для всех исследуемых образцов частицы имеют игольчатую форму, длина и ширина кристаллов 40 – 65 нм и 3,0 – 6,5 нм соответственно. На рисунке 2 в качестве примера представлено ПЭМ-изображение синтезированного образца Ca_d -КГАП 1,50.

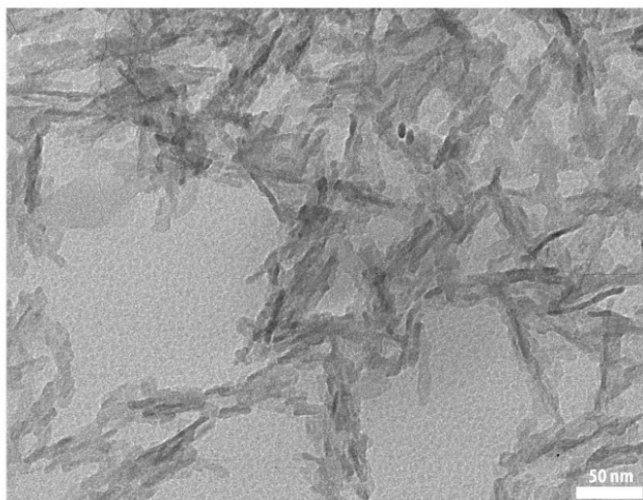


Рис. 2. ПЭМ-изображение образца Ca_d -КГАП 1,50.

После высушивания синтезированных гидрогелей, образцы Са_д-КГАП и КГАП представляют собой порошки белого цвета. В ходе проведенного анализа РЭМ-изображений установлено, что во всех синтезированных образцах нанокристаллы агломерируют в более крупные частицы размером 1-5 мкм. На рисунке 3 приведены РЭМ-изображения для порошков Са_д-КГАП 1,50 и КГАП 1,67 в качестве примера.

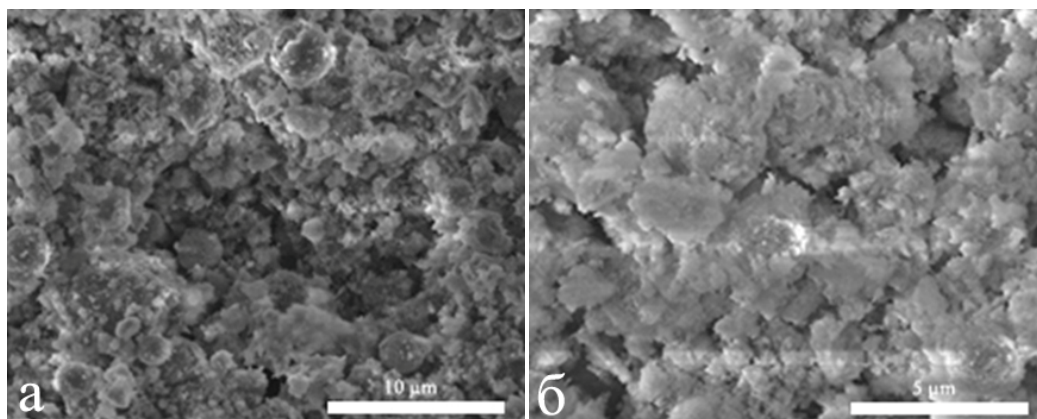


Рис. 3. РЭМ-изображения порошков: а) Са_д-КГАП 1,50 и б) КГАП 1,67.

Методом БЭТ установлено, что все исследуемые материалы обладают достаточно развитой удельной поверхностью (табл. 2), что может положительно отразиться на сорбционных свойствах данных образцов. Следует отметить, что для Са_д-КГАП наблюдается тенденция к увеличению удельной поверхности, в то время как объем пор и размер пор уменьшаются по мере того, как уменьшается отношение Са/(РО₄³⁻+СО₃²⁻).

Таблица 2

Текстурные характеристики образцов Са_д-КГАП и КГАП

Образец	Удельная поверхность, м ² /г	Объем пор, см ³ /г	Средний диаметр пор, Å
Са _д -КГАП 1,33	133,4	0,42	124,4
Са _д -КГАП 1,50	131,5	0,44	132,0
Са _д -КГАП 1,58	128,9	0,43	134,0
КГАП 1,67	142,5	0,39	109,1

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Методом осаждения из водных растворов синтезированы наноразмерные образцы $\text{Ca}_d\text{-KГАП}$ с мольными соотношениями $\text{Ca}/(\text{PO}_4^{3-} + \text{CO}_3^{2-})$ – 1,33; 1,50; 1,58 в присутствии цитрат-ионов.
2. Установлено, что исследуемые материалы являются однофазными и могут быть идентифицированы как модификация ГАП. Средний размер кристаллитов составляет от 17,21 до 23,4 нм.
3. Все синтезированные образцы в виде гидрогелей имеют игольчатую форму кристаллов длиной 40–65 нм и шириной 3,0–6,5 нм.
4. Порошки $\text{Ca}_d\text{-KГАП}$ и KГАП обладают достаточно развитой удельной поверхностью (128,9–142,5 м²/г).

Работа выполнена с использованием научного оборудования Центра коллективного пользования "Технологии и Материалы НИУ "БелГУ".

Список литературы

1. Haider A. Recent advances in the synthesis, functionalization and biomedical applications of hydroxyapatite: a review / A. Haider, S. Haider, S. S. Han, I-K Kang // RSC Advances. – 2017. – Vol. 7. – P. 7442–7458.
2. Mucalo M., editor. Hydroxyapatite (Hap) for Biomedical Applications. 1st Edition / Mucalo M. // Elsevier. – 2015. – 404 p.
3. Kasir R. Inductive biomaterials for bone regeneration / R. Kasir, V. N. Vernekar, C. T. Laurencin // Materials Research. – 2017. – Vol. 32. – P. 1047–1060.
4. Pietak A. M. Silicon substitution in the calcium phosphate bioceramics / Pietak A. M., Reid J. W., Stott M. J., Sayer M. // J. Biomater. – 2007. – Vol. 28. – P. 4023–4032.
5. Best S. M. The osteogenic behaviour of silicon substituted hydroxyapatite / S. M. Best, S. Zou, R. Brooks, J. Huang, N. Rushton, W. Bonfield // J. Key Eng. Mater. – 2008. – Vol. 361. – P. 985–998.
6. Трубицын М. А. Исследование резорбируемости и биосовместимости модифицированных наногидроксиапатитов / М. А. Трубицын, Н. Г. Габрук, С. В. Надеждин, В. Т. Ле, В. Д. Доан // Журнал Нанотехнологии и Охрана Здоровья. – М: Изд-во «ВЕЛТ». – 2013. – Вып. 3 (16). – С. 44–48.
7. Abidi S. A. Synthesis and characterization of nano-hydroxyapatite powder using wet chemical precipitation reaction / S. A. Abidi, Q. Murtaza // J. Mater. Sci. Technol. – 2013. – Vol. 30. – P. 307–310.
8. Youness R. A. Molecular modeling, FTIR spectral characterization and mechanical properties of carbonated-hydroxyapatite prepared by mechanochemical synthesis / R. A. Youness, M. A. Taha, H. Elhaes, M. Ibrahim // Mater Chem Phys. – 2017. – Vol. 190. – P. 209–218.
9. Qi Y. The morphology control of hydroxyapatite microsphere at high pH values by hydrothermal method / Y. Qi, J. Shen, Q. Jiang, B. Jin, J. Chen, X. Zhang // Adv Powder Technol. – 2015. – Vol. 26. – P. 1041–1046.
10. AlHammad M. S. Nanostructure hydroxyapatite-based ceramics by sol–gel method / M. S. AlHammad // J Alloys Compd. – 2016. – Vol. 661. – P. 251–256.
11. Skwarek E. Adsorption of citrate ions on hydroxyapatite synthesized by various methods / E. Skwarek, W. Janusz, D. Sternik // J Radioanal Nucl Chem. – 2014. – Vol. 299. – P. 2027–2036.
12. Воробьева Л. А. Химический анализ почв. / Воробьева Л. А. – М.: Изд-во МГУ, 1998. – 272 с.
13. ГОСТ 24024.9-81. Фосфор и неорганические соединения фосфора. Метод определения монофосфатов. М.: Изд-во стандартов, 1997. – 3 с.
14. Гинье А. Рентгенография кристаллов. Теория и практика. / Гинье А. – М.: ГИФМЛ, 1961. – 604 с.

SYNTHESIS AND INVESTIGATION STRUCTURAL-MORPHOLOGICAL OF THE PROPERTIES OF CALCIUM-DEFICIENT CARBONATED HYDROXYAPATITE IN THE PRESENCE OF CITRATE-IONS

Trubitsyn M. A., Hoang Viet Hung, Furda L. V.

Belgorod National Research University, Belgorod, Russia

E-mail: hung.hoangviet191290@gmail.com

It is known that the chemical composition of human and animal bones does not correspond to stoichiometric hydroxyapatite and can be considered as calcium-deficient carbonate-containing hydroxyapatite with a molar ratio $\text{Ca}/(\text{PO}_4^{3-} + \text{CO}_3^{2-}) < 1,67$ [$\text{Ca}_{10-d}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x-y}(\text{CO}_3)_y(\text{OH})_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$, CadHCAp], which has better bioactivity and bioresorbability compared to unmodified hydroxyapatite. As a result, in recent years, CadHCAp has been very effectively used as biocompatible implants.

In the present work, samples CadHCAp were obtained at different $\text{Ca}/(\text{PO}_4^{3-} + \text{CO}_3^{2-})$ molar ratios by precipitation from aqueous solutions. The synthesis was carried out in the presence of citrate ions in order to inhibit growth and prevent crystal aggregation. The obtained samples were investigated using various physical-chemical methods of analysis. The results of x-ray phase analysis (XRD) showed that all synthesized materials are single-phase and can be identified as a modification of HAp. The average crystallite size of CadHCAp and CHA ranges from 17.21 to 23.4 nm. Transmission electron microscopy (TEM) analysis reveals that the nanoparticles of all studied samples were found in the form of needle-shaped. The length and width of the crystals is 40 – 65 nm and 3.0 – 6.5 nm, respectively. After drying the synthesized hydrogels, white powders of CadHCAp and CHA were received. The results of analysis by scanning electron microscopy (SEM) showed that, the obtained nanocrystals agglomerate into larger particles (1–5 μm). By the method of low-temperature adsorption-desorption of nitrogen (BET), it was found that the studied materials have a developed specific surface. The obtained results allow concluding that samples of CadHCAp are promising biomaterials for medical applications.

Keywords: hydroxyapatite, calcium-deficient, carbonate-containing, biomaterial, citrate ions, phase composition, particle size.

References

1. Haider A., Haider S., Han S. S., Kang I-K., Recent advances in the synthesis, functionalization and biomedical applications of hydroxyapatite: a review, *RSC Advances*, **7**, 7442 (2017).
2. Mucalo M., editor., Hydroxyapatite (Hap) for Biomedical Applications. 1st Edition, *Elsevier*, 404p (2015).
3. Kasir R., Vernekar V. N., Laurencin C. T., Inductive biomaterials for bone regeneration, *Materials Research*, **32**, 1047 (2017).
4. Pietak A. M., Reid J. W., Stott M. J., Sayer M., Silicon substitution in the calcium phosphate bioceramics, *J. Biomater*, **28**, 4023 (2007).
5. Best S. M., Zou S., Brooks R., Huang J., Rushton N., Bonfield W., The osteogenic behaviour of silicon substituted hydroxyapatite, *J. Key Eng. Mater*, **361**, 985 (2008).

6. Trubitsyn M. A., Gabruk N. G., Nadezhdin S. V., Le Van Thuan, Doan Van Dat., Investigation of resorbability and biocompatibility of modified nanohydroxyapatites, *Nanotechnology Journal and Health Protection*, **3** (16), 44 (Publishing House "WELT", Moscow, 2013). (in Russ.)
7. Abidi S. A., Murtaza Q., Synthesis and characterization of nano-hydroxyapatite powder using wet chemical precipitation reaction, *J. Mater. Sci. Technol*, **30**, 307 (2013).
8. Youness R. A., Taha M. A., Elhaes H., Ibrahim M., Molecular modeling, FTIR spectral characterization and mechanical properties of carbonated-hydroxyapatite prepared by mechanochemical synthesis, *Mater Chem Phys*, **190**, 209 (2017).
9. Qi Y., Shen J., Jiang Q., Jin B., Chen J., Zhang X., The morphology control of hydroxyapatite microsphere at high pH values by hydrothermal method, *Adv Powder Technol*, **26**, 1041 (2015).
10. AlHammad M. S. Nanostructure hydroxyapatite-based ceramics by sol–gel method, *J Alloys Compd*, **661**, 251 (2016).
11. Skwarek E., Janusz W., Sternik D., Adsorption of citrate ions on hydroxyapatite synthesized by various methods, *J Radioanal Nucl Chem*, **299**, 2027 (2014).
12. Vorobieva L. A., Soil chemical analysis, 272 p. ("MGU Publishing House", Moscow, 1998). (in Russ.)
13. GOST 24024.9-81., Phosphorus and inorganic phosphorus compounds. Method for the determination of monophosphates, 3 p. ("Publishing house of standards", Moscow, 1997). (in Russ.)
14. Guinier A., Crystal X-ray. Theory and practice, 604 p. ("GIFFL", Moscow, 1961). (in Russ.)

УДК 535.338.334

О ФОРМЕ КОНТУРА СПЕКТРАЛЬНОЙ ЛИНИИ 1315 нм АТОМАРНОГО ЙОДА

Шейх-Заде М. И.

*ГБОУВО РК «Крымский инженерно-педагогический университет», Симферополь,
Республика Крым, Россия
E-mail: ems@kipu-rc.ru*

Проведена аппроксимация экспериментального контура спектральной линии 1315 нм атомарного йода функциями Коши, Гаусса и эмпирической функцией $f(k, x)$. Проведён сравнительный анализ аппроксимации этого контура указанными функциями и функцией Фойгта. Данные по аппроксимации экспериментального контура функцией Фойгта взяты из литературных источников. Показано, что из четырёх рассмотренных функций, функции Фойгта и $f(k, x)$ описывают этот контур более удовлетворительно и с сопоставимым качеством.

Ключевые слова: спектральная линия, контур, аппроксимация.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что испускание электромагнитного излучения атомами не является строго монохроматическим [1–4]. Энергия излучения всегда распределяется в некотором интервале частот. Графическое представление такого распределения образует контур спектральной линии. Характер распределения энергии по частотам определяет форму контура. Одной из важных задач теоретической спектроскопии является аналитическое описание формы контуров спектральных линий.

На формирование формы контуров спектральных линий оказывают влияние различные процессы. Основными из них являются: радиационное затухание, эффект Доплера, столкновения между атомами. Под влиянием каждого из этих процессов формируются контуры, которые описываются функциями Коши, Гаусса, Лоренца [1–4]. Весьма гибкой и универсальной функцией для аппроксимации контуров является функция Фойгта [2–7], которая учитывает все названные механизмы уширения спектральных линий.

В работе [8] для аппроксимации контуров полос ИК поглощения была предложена эмпирическая функция, которая в центрированном и нормированном к единице в максимуме виде выглядит следующим образом:

$$f(k, x) = \left\{ 1 + \frac{[1 + (2 \ln 2)(k - 1)]x^2}{k^2} \right\}^{-(k+1)/2},$$

где k -параметр, значение которого должно быть определено для аппроксимируемого контура, $x = 2(\nu - \nu_0)/\Delta\nu_{1/2}$, ν_0 – волновое число в максимуме контура, $\Delta\nu_{1/2}$ – полуширина контура (ширина контура на половине высоты). Функция $f(k, x)$

обладает предельными свойствами: при $k=1$ превращается в функцию Коши, а при $k \rightarrow \infty$ превращается в функцию Гаусса.

Целью данной работы является применение функции $f(k,x)$ для аппроксимации экспериментального контура спектральной линии 1315 нм атомарного йода и сравнение качества аппроксимации этого контура функцией $f(k,x)$ и функциями Коши, Гаусса, Фойгта. В данной работе, как и в [8], не предполагается рассматривать вопрос о физической интерпретации функции $f(k,x)$ в силу эмпирического характера этой функции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве контура спектральной линии для тестирования функции $f(k,x)$ выбран контур линии 1315 нм атомарного йода, который в графическом виде представлен в работе [7]. Для целей настоящей работы этот контур был оцифрован. Для оценки качества аппроксимации рассматриваемого контура той или иной функцией необходимо выбрать критерий наилучшего приближения. В литературе часто в качестве такого критерия используют значение коэффициента детерминации R^2 . Этот критерий используется и в данной работе. При аппроксимации контура функцией $f(k,x)$ находится такое значение k , при котором значение R^2 стремится к максимальному значению, равному единице.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экспериментальный контур линии 1315 нм атомарного йода, построенный на основе данных работы [7], приведён на рис.1 в центрированном и нормированном к единице по интенсивности в максимуме виде (точки).

Анализ параметров этого контура показал, что контур является ассиметричным. Поэтому необходимо по-отдельности аппроксимировать низкочастотную (НЧ) и высокочастотную (ВЧ) ветви контура. При аппроксимации НЧ- и ВЧ-ветвей контура каждой из рассмотренных функций, были использованы соответственно значения полуширин НЧ- и ВЧ-ветвей экспериментального контура. Результат аппроксимации функцией Коши НЧ-ветви ($R^2=0,9970$) и ВЧ-ветви ($R^2=0,9968$) экспериментального контура показан на рис. 1 (сплошная линия). На рис. 1 также приведён результат аппроксимации функцией Гаусса НЧ-ветви ($R^2=0,9669$) и ВЧ-ветви ($R^2=0,9614$) рассматриваемого экспериментального контура (пунктирная линия). Как из рис. 1, так и из значений R^2 можно видеть, что качество аппроксимации данного контура функцией Гаусса ниже, чем функцией Коши, особенно в области крыльев контура. Из рис. 1 также видно, что экспериментальный контур расположен между контуром Коши и контуром Гаусса. Такой характер расположения экспериментального контура и контуров Коши и Гаусса является типичным как для контуров спектральных линий, так и для контуров полос ИК поглощения [9].

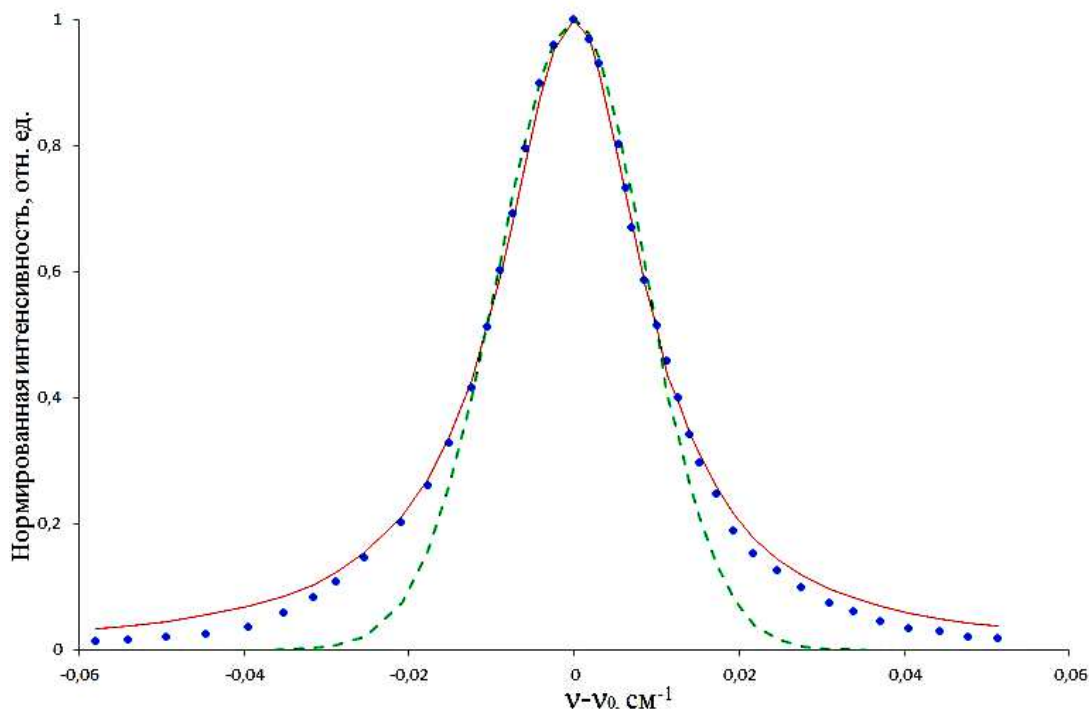


Рис. 1. Экспериментальный контур линии 1315 нм атомарного йода (точки) и его аппроксимация функциями Коши (сплошная линия) и Гаусса (пунктирная линия).

В настоящее время для аппроксимации контуров спектральных линий часто применяется функция Фойгта [10], которая может описывать контуры различной формы – от контура Коши (при $a \rightarrow \infty$) до контура Гаусса (при $a=0$), где a – параметр функции Фойгта. На рис. 2 показан результат аппроксимации экспериментального контура линии 1315 нм атомарного йода (точки) функцией Фойгта (сплошная линия), выполненный в работе [7].

На рис. 2 также приведён результат аппроксимации функцией $f(k, x)$ НЧ-ветви ($R^2=0,9991$ при $k=1,60$) и ВЧ-ветви ($R^2=0,9991$ при $k=1,55$) экспериментального контура (пунктирная линия). Для наглядности и облегчения анализа результатов, все рассчитанные данные сведены в таблицу 1.

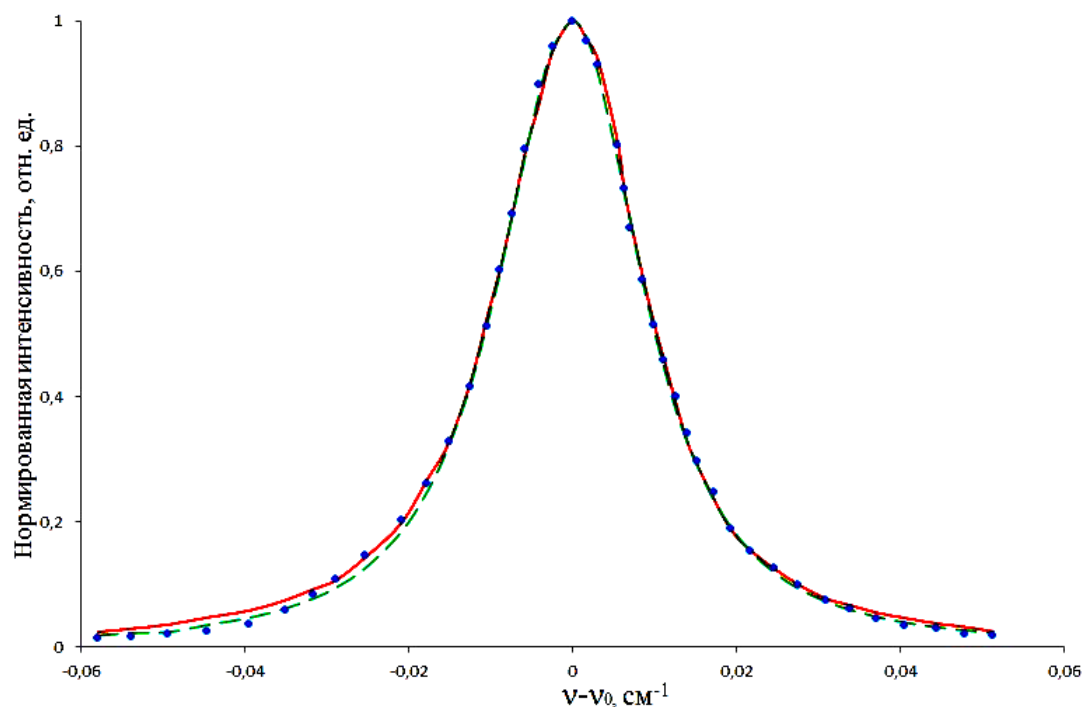


Рис. 2. Экспериментальный контур линии 1315 нм атомарного йода (точки) и его аппроксимация функциями Фойгта (сплошная линия) и функцией $f(k, x)$ (пунктирная линия).

НЧ-ветви соответствует значение $a=1,64$, а ВЧ-ветви – значение $a=1,91$ [7]. Проведя оцифровку этого контура, были рассчитаны значения R^2 , которые оказались равными 0,9985 для НЧ-ветви и 0,9994 для ВЧ-ветви.

Таблица 1

Значения параметров аппроксимирующих функций и R^2 , соответствующие критерию наилучшего приближения

Аппроксимирующие функции	НЧ-ветвь		ВЧ-ветвь	
	Параметр функции	R^2	Параметр функции	R^2
Функция Коши	-	0,9970	-	0,9968
Функция Гаусса	-	0,9669	-	0,9614
Функция Фойгта	$a=1,64$	0,9985	$a=1,91$	0,9994
Функция $f(k, x)$	$k=1,60$	0,9991	$k=1,55$	0,9991

Как видно из рис. 2, центральная часть рассматриваемого экспериментального контура (на расстояниях $\nu - \nu_0 \approx \pm 1,5 \cdot \Delta \nu_{1/2}$) аппроксимируется функциями Фойгта и $f(k, x)$ с сопоставимым качеством, а в области крыльев ($\nu - \nu_0 > \pm 1,5 \cdot \Delta \nu_{1/2}$) качество аппроксимации функцией $f(k, x)$ несколько лучше, чем функцией Фойгта.

Полученные результаты показывают, что из четырёх рассмотренных функций, функции Фойгта и $f(k, x)$ более удовлетворительно аппроксимируют экспериментальный контур спектральной линии 1315 нм атомарного йода, приведённый в [7]. Можно предложить, что функция $f(k, x)$ может быть использована для аппроксимации контуров спектральных линий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведён сравнительный анализ качества аппроксимации экспериментального контура спектральной линии 1315 нм атомарного йода функциями Коши, Гаусса, Фойгта, $f(k, x)$. Показано, что функции Фойгта и $f(k, x)$ описывают этот контур более удовлетворительно и с сопоставимым качеством.

Список литературы

1. Королёв Ф. А. Теоретическая оптика / Ф. А. Королёв. – М.: Высшая школа, 1966. – С. 123–138.
2. Ленг К. Р. Астрофизические формулы / К. Р. Ленг – М.: Мир, 1978. – Т.1. – 448 с.
3. Пеннер С. С. Количественная молекулярная спектроскопия и излучательная способность газов / С. С. Пеннер. – М.: ИЛ, 1963. – С. 36–60.
4. Митчелл А. Резонансное излучение и возбужденные атомы / А. Митчелл, М. Земанский. – М.:ОНТИ, 1937. – С. 87–277.
5. Методы исследования плазмы / Под ред. В. Лохте – Хольтгревена. – М.: Мир, 1971. – С. 103–105.
6. Харрис Д. О коэффициенте поглощения в линии, обусловленном эффектом Допплера и затуханием / Д. Харрис // Сб.: Современные проблемы астрофизики и физики Солнца. – М.: ИЛ, 1951. – С. 50–55.
7. Наумова Н. Н. Определение температуры и давления газов по фойгтовскому профилю спектральной линии / Н. Н. Наумова, В. Н. Хохлов // Оптич. журн. – 2006. – Т. 73, № 8. – С. 23–26.
8. Шейх-Заде М. И. Эмпирическая функция для аппроксимации контуров полос ИК поглощения / М. И. Шейх-Заде // Учёные записки Крымского федерального университета им. В. И. Вернадского. Биология. Химия. – 2019. – Т.5(71), №2. – С. 225–229.
9. Цяченко Ю. П. Форма контуров колебательных полос поглощения жидких хлороформа и бромформа / Ю. П. Цяченко // Журн. Прикл. Спектр. – 1961. – Т.11, №2. – С. 192–195.
10. Михеев П. А. Электроразрядные генераторы атомарного йода и метастабильных атомов аргона и криптона для активных сред газовых лазеров и оптические методы исследования таких сред: Дисс. ... докт. физ.-мат. наук / П. А. Михеев. – Самара, 2016. – 168с.

ABOUT A FORM 1315 nm SPECTRAL LINE CONTOUR OF ATOMIC IODINE

Sheikh-Zade M.-I.

Crimean Engineering and Pedagogical University, Simferopol, Crimea, Russian Federation

E-mail: ems@kipu-rc.ru

Emission of electromagnetic radiation atoms is not monochromatic. Radiant every is always distributed in some interval of frequencies. The nature of an energy distribution by frequencies determines a form of spectral line contour. One of important problems of a theoretical spectroscopy is the analytical description of form spectral line contours.

For approximation of spectral line contours functions Cauchy (Lorentz), Gauss, Voigt are often used. The Voigt function is the most flexible and universal for these purposes. All specified functions are connected to particular physical processes which lead to formation of contours of definite form.

In this work for approximation of spectral line contours the empirical function is offered, which is not bound with processes definite these contours form. This function in aligned and the normalized to unit in a maximum looks as follows:

$$f(k, x) = \left\{ 1 + \frac{[1 + (2 \ln 2)(k - 1)]x^2}{k^2} \right\}^{-(k+1)/2},$$

were the k – parameter which value has to be defined for an approximable contour, $x = 2(\nu - \nu_0)/\Delta\nu_{1/2}$, ν_0 – wave number in a maximum of contour, $\Delta\nu_{1/2}$ – half-width of a contour (contour width on a half of height). Function $f(k, x)$ has the extreme properties: at $k=1$ turns into function of Cauchy, and at $k \rightarrow \infty$ turns into function of Gauss.

For comparisational evaluation approximating properties of the specified functions their testing is made on the experimental contour 1315 nm spectral line of an atomic iodine which is taken from literary references. This contour is asymmetric, therefore low-frequency and high-frequency branches of a contour were separately approximated. For evaluation of approximation quality the value of coefficient of determination R^2 is used. At approximation by functions of Cauchy (Lorentz), Gauss, Voigt, $f(k, x)$ a low-frequency branch of R^2 value were equal 0.9970, 0.9669, 0.9985, 0.9991 respectively, and high-frequency branch – equal 0.9968, 0.9614, 0.9994, 0.9991 respectively.

The received results show that from four considered functions, the Voigt and $f(k, x)$ functions more satisfactorily approximate the considered contour and with comparable quality. The assumption is made that function $f(k, x)$ can be used for approximation of spectral line contours.

Keywords: spectral line, contour, approximate.

References

1. Korolyov F. A., *Theoretical optics*, p.123 (Higher school, Moscow, 1966). (in Russ.).
2. Lang K. R., *Astrophysical formulae*, 1, 448 p. (Mir, Moscow, 1978). (in Russ.).
3. Penner S. S., *Quantitative molecular spectroscopy and gas emissivities*, p. 36. (IL, Moscow, 1963). (in Russ.).
4. Mitchell A. C. G., Zemansky M. W., *Resonance radiation and excited atoms*, p. 87 (ONTI, Moscow, 1937). (in Russ.).

5. *Plasma research methods*, Ed. by Lokhte Kholtgreven V., p. 103. (Mir, Moscow, 1971). (in Russ.).
6. Harris D., *On the line-absorption coefficient due to Doppler effect and damping. In: Modern problems of astrophysics and Physics of Sun*, p. 50. (IL, Moscow, 1951). (in Russ.).
7. Naumova N. N., Khokhlov V. N., Temperature and gas pressure determination by spectral line Voigt profiles, *Opt. Zhurn.*, **73** (8), 23 (2006). (in Russ.).
8. Sheikh-Zade M. I., Empirical function for approximation of infrared absorption band contours, *Scientific Notes of V. I. Vernadsky Crimean Federal University. Biology. Chemistry*, **5**(2) 255 (2019). (in Russ.).
9. Cyashhenko Yu. P., Shape of vibration absorption bands of liquid chloroform and bromoform, *Zhurn. Prikl. Spectr.*, **11**(2), 192 (1961). (in Russ.).
10. Mikheev P. A., Electric-discharge generators of atomic iodine and metastable atoms of argon and krypton for active substances of gas lasers and optical methods of a research of such substances: Diss. ... doctor. phys. and mathem. sciences, 168 p. (Samara, 2016).

УДК 544.723.2:579.81.843.4:661.183

ИЗУЧЕНИЕ ИММОБИЛИЗАЦИИ МОРСКИХ СВЕЯЩИХСЯ БАКТЕРИЙ НА ВЫСОКОДИСПЕРСНОМ КРЕМНЕЗЕМЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТРАДИЦИОННЫХ И ЦИФРОВЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Шемшединова Э. Ш., Морозкина Е. В., Шарох А. А., Бейтуллаев А. М., Кацев А. М.

*Медицинская академия имени С.И. Георгиевского (структурное подразделение) ФГАОУ ВО
«Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского», Симферополь, Республика
Крым, Россия
E-mail: elvisa.shemshedinova@mail.ru*

Биолюминесцентные системы находят широкое применение в различных областях медико-биологических исследований. Их использование основано на эмиссионном ответе фотобактерий на токсический фактор, что служит интегральной оценкой токсичности. Контроль интенсивности свечения (биолюминесценции) в процессе измерений осуществляется инструментально, с помощью био- и хемилюминометров. Однако, биолюминесцентные технологии использования эмиссии живых микроорганизмов, как аналитического сигнала, требует дорогостоящего оборудования. В данной работе были получены образцы иммобилизованных на высокодисперсном кремнеземе (ВДК) фотобактерий. Исследована возможность оценки интенсивности свечения морских светящихся бактерий *Photobacterium leiognathi* Sh1 приборными методами и с использованием фотографических изображений и последующей компьютерной обработкой с помощью программы ImageJ.

Ключевые слова: биолюминесцентные аналитические технологии, *Photobacterium leiognathi* Sh1, биолюминесценция, высокодисперсный кремнезем, программа ImageJ.

ВВЕДЕНИЕ

Использование биосенсорных систем в аналитических целях находят всё большее применение в различных областях медико-биологических исследований [1–3]. Важным этапом в создании чувствительного элемента оптического биосенсора является изучение количественных характеристик биолюминесценции. Собственное свечение морских или рекомбинантных бактерий, возникающее в результате жизнедеятельности является аналитическим сигналом в биолюминесцентных аналитических технологиях. Данная технология основана на эмиссионном ответе фотобактерий на токсический фактор, что служит интегральной оценкой токсичности. Контроль интенсивности свечения (биолюминесценции) в процессе измерений осуществляется инструментально, с помощью био- и хемилюминометров. Однако, данная аналитическая технология требует дорогостоящего оборудования, а также длительной и трудоёмкой процедуре пробоподготовки [4, 5]. В данной работе исследуется возможность оценки интенсивности свечения морских светящихся бактерий приборными методами и с использованием фотографических изображений и последующей компьютерной обработкой с помощью программы ImageJ. Image J –

это программа для обработки изображений, написанная на языке Java сотрудниками National Institutes of Health [6–12].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В настоящей работе использовались морские светящиеся бактерии Азовского моря (*Photobacterium leiognathi* Sh1). Бактерии культивировали на жидком питательном бульоне (NIMEDIA, Индия) в течение 20–24 ч при температуре 25 °С. В качестве сорбента использовали высокодисперсный кремнезём – ВДК (Полисорб МП, АО «Полисорб» Россия, Челябинская обл., г. Копейск). Исследуемые образцы содержали 10 мг/мл сорбента и различное количество ($2,6 \cdot 10^7$; $7,0 \cdot 10^7$; $1,2 \cdot 10^8$; $1,7 \cdot 10^8$; $2,3 \cdot 10^8$ кл/мл) суточной бактериальной суспензии. Контрольные пробы не содержали сорбента. Все образцы готовили с добавлением 0,3 мл 0,1 М трис-НСl буферного раствора с рН=7,2 и доводили 3 % раствором хлорида натрия до общего объема 3 мл. Для установления сорбционного равновесия образцы инкубировали 30 мин в режиме постоянного перемешивания (СВ-1, Россия). Носитель с иммобилизованными бактериями отделяли от жидкой среды центрифугированием в течение 5 мин при 1000 об/мин с помощью центрифуги ОПН-3 («Дастан», Кыргызская республика).

Биолюминесцентный сигнал регистрировали на биолюминометре БХЛ 06 (Россия). Результаты биолюминесцентного анализа рассчитывали в %, как:

$$I = I/I_0 \times 100 \%,$$

где I – интенсивность биолюминесценции в присутствии ВДК; I_0 – интенсивность биолюминесценции в контроле.

Концентрацию бактерий в контрольных образцах без сорбента оценивали по значению оптической плотности. Измерения вели при 600 нм с помощью спектрофотометра СФ-2000 (ЛОМО, Россия). Для пересчета значений оптической плотности в концентрацию бактериальных клеток использовали калибровочный график $y = 9 \cdot 10^{-10}x + 0,025$ описанный в работе [5]. Концентрацию бактерий на сорбенте определяли по разности оптической плотности в контрольном образце и в среде после отделения сорбента.

Все эксперименты проводили в трехкратных повторениях. Полученные результаты обрабатывали с использованием компьютерной программы Microsoft Excel.

Изображения свечения фотобактерий были получены с помощью цифрового фотоаппарата Nikon D5200 (Япония, f/7.1, 30с, 28мм). Анализ и обработка изображений проводился с помощью программы Image J (National Institutes of Health, USA), программа находится в свободном доступе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее проведенные исследования [4] показали, что при контакте фотобактерий с высокодисперсным кремнеземом (ВДК) происходит адсорбционная иммобилизация клеток на поверхности носителя. С целью изучения количественных характеристик процесса адсорбции были использованы приборные

методы (спектрофотометрический и биолюминесцентный). Для этого были получены образцы *P. leiognathi* Sh1, иммобилизованные на сорбенте, с различным количеством бактериальных клеток в твердой фазе носителя. По результатам измерений оптической плотности ($\lambda=600$ нм) надосадочной жидкости в исследуемых образцах было рассчитано количество иммобилизованных на сорбенте клеток (таблица 1). Полученные данные показали, что с ростом количества бактериальной суспензии в пробах наблюдается закономерное увеличение количества клеток на твердой фазе сорбента и достигает максимального значения $1,44 \cdot 10^8$ кл/мл.

Таблица 1

Приблизная оценка (спектрофотометр) содержания бактериальных клеток *P. leiognathi*

Количество клеток	Содержание бактериальной суспензии, мкл				
	100	200	300	400	500
контроль	$2,6 \cdot 10^7$	$7,0 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^8$	$1,7 \cdot 10^8$	$2,3 \cdot 10^8$
надосадочная жидкость	$9,0 \cdot 10^6$	$2,8 \cdot 10^7$	$5,3 \cdot 10^7$	$7,1 \cdot 10^7$	$8,9 \cdot 10^7$
осадок	$1,7 \cdot 10^7$	$4,2 \cdot 10^7$	$6,8 \cdot 10^7$	$1,08 \cdot 10^8$	$1,44 \cdot 10^8$

Биолюминесцентный анализ надосадочной жидкости и твердой фазы сорбента с адсорбированными фотобактериями также демонстрирует рост интенсивности свечения с увеличением содержания бактериальных клеток в суспензии (таблица 2). Полученные данные хорошо согласуются с представленными выше результатами спектрофотометрического измерения оптической плотности.

Таблица 2

Приблизная оценка (биолюминометр) интенсивности свечения *P. leiognathi*

Биолюминесценция в (%)	Содержание бактериальной суспензии, мкл				
	100	200	300	400	500
надосадочная жидкость	47,1	94,1	164,7	205,9	276,5
осадок	364,7	964,7	1611,8	2117,6	2764,7

Важной характеристикой процесса иммобилизации является удельная активность эмиссии. В ряде работ [4, 5] показано, что в ходе процедуры иммобилизации происходит изменение эмиссионной активности клеток. Это может быть связано как с методикой иммобилизации, так и с выбором носителя. Поэтому представляет интерес определение удельной биолюминесценции свободных и связанных с носителем бактерий (рисунок 1). Как следует из рисунка 1, удельное свечение

иммобилизованных фотобактерий на ВДК возрастает в 9–13 раз по отношению к свободным. В то время как увеличение удельной люминесценции свободных бактерий и бактерий в жидкой фазе после отделения сорбента незначительно и связано с ростом содержания бактериальных клеток в исследуемых образцах.

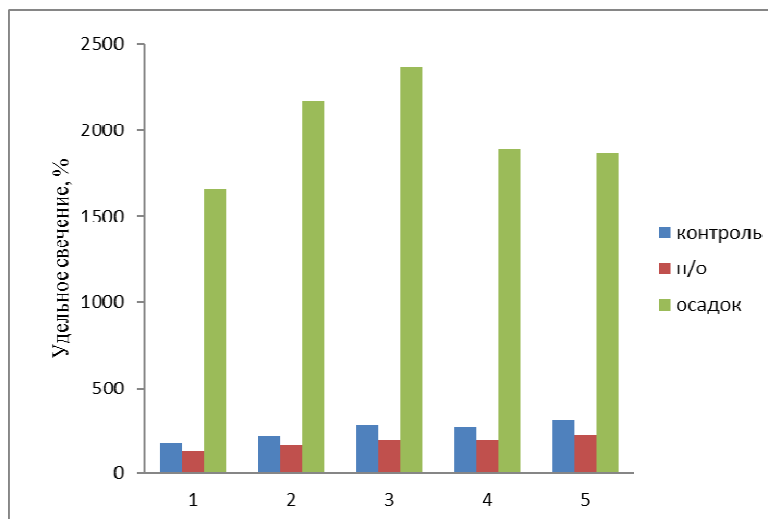


Рис. 1. Удельное свечение свободных и иммобилизованных бактерий.

Следует отметить, что приборные методы регистрации свечения и его количественная оценка длительны и трудоемки. Поэтому для этих целей в данной работе были использованы компьютерные технологии с применением программы Image J. ImageJ — программа с открытым исходным кодом для анализа и обработки изображений. Написана на языке Java сотрудниками National Institutes of Health и распространяется без лицензионных ограничений как общественное достояние. Функциональные возможности программы и гибкость настроек позволяет применять ее в широком спектре гистологических и микробиологических исследованиях других дисциплинах, связанных с анализом изображений, в качестве альтернативы частному программному обеспечению [6]. В данной работе графический редактор ImageJ был использован для упрощения трудоемкой процедуры пробоподготовки и приборной регистрации интенсивности свечения и оптической плотности контрольных и исследуемых образцов. С этой целью предварительно были получены снимки собственного свечения свободных бактерий (рисунок 2) и иммобилизованных на носителе (рисунок 3) в темноте. Как видно из рисунка 2 снимки контрольных образцов были с разной интенсивностью эмиссии. Визуальная оценка иммобилизованных форм светящихся бактерий продемонстрировала, что биолуминесценция образцов наиболее интенсивна в нижней части пробирок, во всём объёме сорбента, чем в надосадочной жидкости. Интенсивность свечения увеличивались с ростом содержания бактериальной

суспензии как в контрольных (рисунок 3), так и в исследуемых образцах с ВДК (рисунок 2).

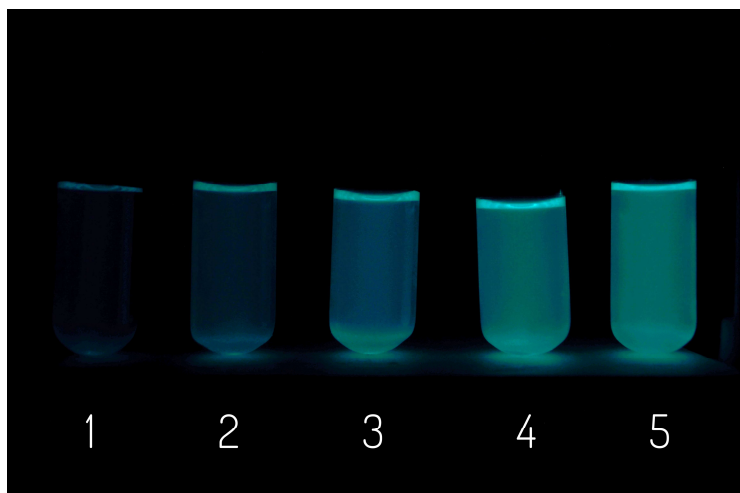


Рис. 2. Фотографическое изображение контрольных образцов в темноте под действием собственного излучения *P. leiognathi* Sh1 с различным содержанием бактериальной суспензии (кл/мл): 1 – $2,6 \cdot 10^7$; 2 – $7,0 \cdot 10^7$; 3 – $1,2 \cdot 10^8$; 4 – $1,7 \cdot 10^8$; 5 – $2,3 \cdot 10^8$.

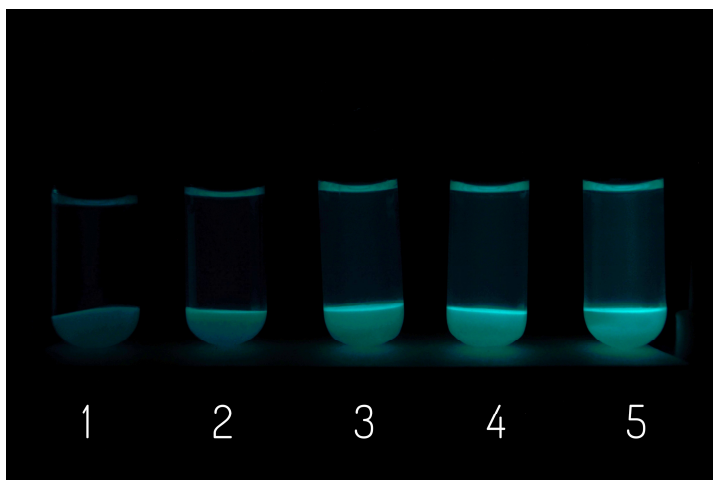


Рис. 3. Фотографическое изображение образцов, полученных в темноте под действием собственного излучения иммобилизованных на ВДК *P. leiognathi* Sh1 с различным содержанием бактериальной суспензии (кл/мл): 1 – $2,6 \cdot 10^7$; 2 – $7,0 \cdot 10^7$; 3 – $1,2 \cdot 10^8$; 4 – $1,7 \cdot 10^8$; 5 – $2,3 \cdot 10^8$.

Далее снимки свечения полученных образцов обработали с помощью графического редактора программы Image J. Анализ снимков проводился после перевода их в 8-битный формат (рисунок 4).

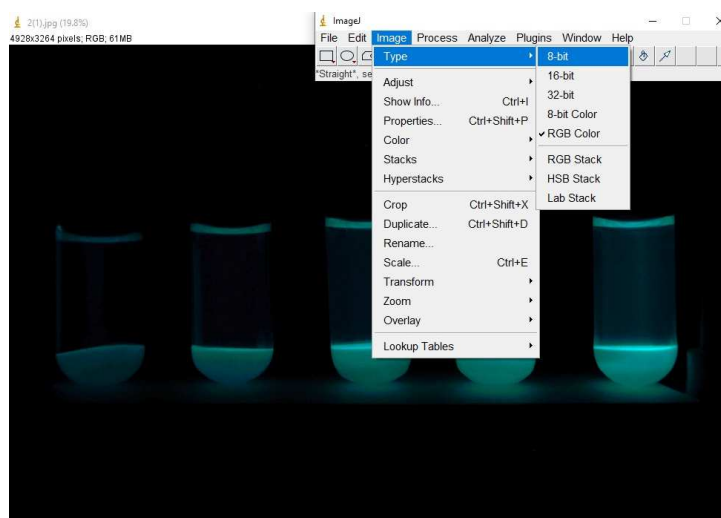


Рис. 4. Открытие снимка свечения в командном окне программы Image J для перевода в 8-битный формат.

После этого были заданы параметры для измерения, выбирался инструмент Point-Tool и расставлялись "маркеры" на исследуемых областях (рисунок 5).

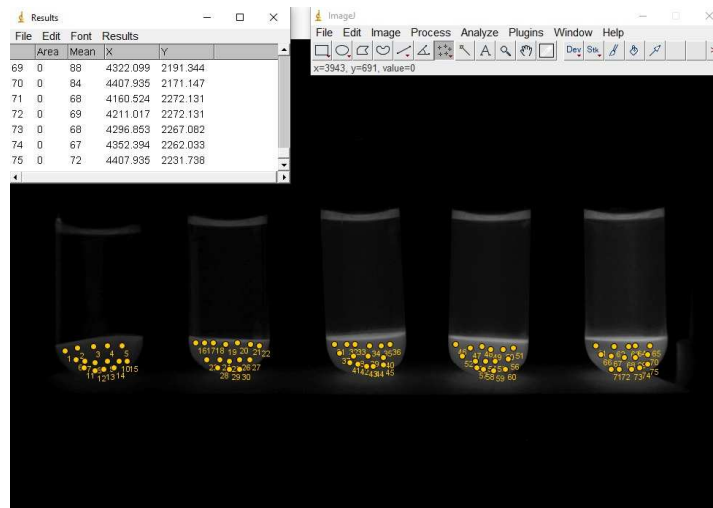


Рис. 5. Выбор параметров для измерения и расстановка маркеров на исследуемых объектах.

После чего измерялась интенсивность свечения (градация серого) надосадочной жидкости и осадка (связанные сорбентом микроорганизмы). Полученные результаты сохранялись: Analyze-Measure. Данные обработки приведены в таблице 3.

Таблица 3
Анализом снимков с помощью графического редактора программы ImageJ

Билюминесценция (%) в осадке	Содержание бактериальной суспензии, мкл				
	100	200	300	400	500
	7,52	12,00	15,90	20,15	21,61

Для целесообразности использования программы ImageJ в изучении количественных характеристик иммобилизации фотобактерий на ВДК была проведена корреляция между приборными и бесприборными методами. Для этого были построены корреляционные графики данных билюминесцентного и спектрофотометрического методов анализа с приборной оценкой по осадку с иммобилизованными фотобактериями (рисунок 6, 7).

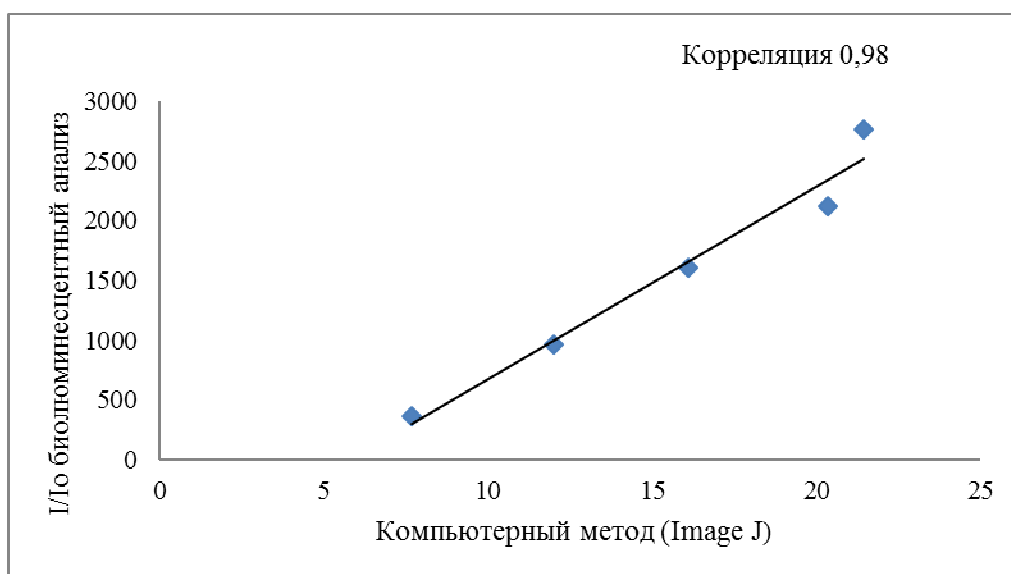


Рис. 6. Корреляционный график сравнения данных билюминесцентного анализа и приборной оценкой по осадку.

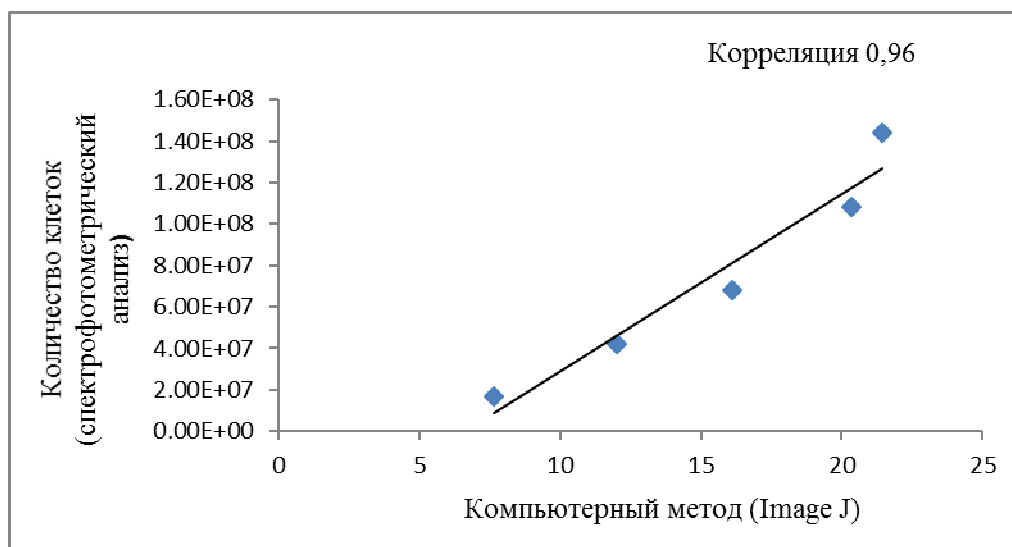


Рис. 7. Корреляционный график сравнения данных по количеству иммобилизованных на сорбенте бактериальных клеток и приборной оценкой по осадку.

Как видно из графиков зависимость приборных и бесприборных методов демонстрирует линейный характер с коэффициентами корреляции между данными приборной оценки биолуминесценции и компьютерной, а также между данными спектрофотометрических измерений и компьютерной составил 0,98 и 0,96.

Таким образом, полученные результаты показывают перспективность использования графического редактора программы ImageJ в оценке интенсивности эмиссии люминесцирующих бактерий и оптической плотности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Были получены образцы иммобилизованных на ВДК фотобактерий с различным количеством бактериальных клеток и проведена их количественная оценка с использованием приборных (спектрофотометрический и биолуминесцентный анализ) и бесприборных (программа Image J) методов.
2. Установлено, что удельное свечение иммобилизованных фотобактерий на ВДК возрастает в 9–13 раз по отношению к свободным
3. Показано, что данные по интенсивности бактериальной люминесценции по осадку, полученные приборным (биолуминесцентный анализ) и программным методом (программа ImageJ), хорошо коррелируют между собой со значением коэффициента корреляции 0,98. Коэффициент корреляции между количеством иммобилизованных на сорбенте клеток, рассчитанных на основе данных спектрофотометрического анализа и интенсивности свечения оцененной с помощью программы ImageJ составил 0,96.

4. Полученные данные свидетельствуют о перспективности использования и совершенствования бесприборных способов регистрации аналитического сигнала в биолюминесцентных аналитических технологиях.

Исследование выполнено в рамках поддержанного программой развития федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского» гранта № ВГ19/2018 и проекта №И/2018/16

Список литературы

1. Дерябин Д. Г. Бактериальная биолюминесценция: фундаментальные и прикладные аспекты / Д. Г. Дерябин. – М.: Наука, 2009. – 248 с.
2. Polakovič M., Progress in biocatalysis with immobilized viable whole cells: systems development, reaction engineering and applications / J. Švitel, M. Bučko, J. Filip, V. Neděla, M. B. Ansorge-Schumacher, P. Gemeine // Biotechnology Letters. – 2017. – V. 39. – № 5. – P. 667–683.
3. Исмаилов А. Д. Фотобиосенсоры на основе светящихся бактерий / А. Д. Исмаилов, Л. Э. Алескерова // Биохимия. – 2015. – Т. 80 (6). – С. 867–881.
4. Морозкина Е. В. Оценка возможности применения высокодисперсного кремнезема как носителя в чувствительном элементе биосенсора / Е. В. Морозкина, Э. Ш. Шемшединова, Э. Р. Абдураманова, А. М. Кацев // Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского, серия «Биология, химия». – 2018. – Т. 4(3). – С. 208–218.
5. Абдураманова Э. Р. Функциональные характеристики свободных и иммобилизованных на неорганических носителях фотобактерий Черного и Азовского морей / Э. Р. Абдураманова, Н. В. Наумова, Л. М. Дерзян, А. М. Кацев // Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского, серия «Биология, химия». – 2018. – Т. 4 (70), №1. – С. 179–187.
6. Мыщик А. В. Использование программы ImageJ для автоматической морфометрии в гистологических исследованиях / Мыщик А. В. // Омский научный вестник. – 2011. – Т. 2 (100). – С. 187–189.
7. Dougherty G. Digital image processing for medical application / G. Dougherty. – Cambridge: Cambridge University Press, 2009. – 485 p.
8. Collins T. J. ImageJ For Microscopy / T. J. Collins // BioTechniques. – 2007. – Vol. 43, № 1. – P. 25–30.
9. Schindelin J. The ImageJ Ecosystem: An Open Platform For Biomedical Image Analysis / Schindelin J., Rueden C. T., Hiner M. C., Eliceiri K. W. // Mol Reprod Dev. – 2015. – Vol. 82, № 7–8. – P. 518–29.
10. Schneider C. A., Rasband W. S., Eliceiri K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. 2012;9(7):671–675. 2009. 82 639–646.
11. Rueden C. T. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data / C. T. Rueden, J. Schindelin, M. C. Hiner, B. E. DeZonia, A. E. Walter, E. T. Arena, K. W. Eliceiri // BMC Bioinformatics. – 2017. – Vol. 18, № 1. – P. 529.
12. Domínguez C. IJ-OpenCV: Combining ImageJ and OpenCV for processing images in biomedicine. / Domínguez C., Heras J., Pascual V. – 2017. – 1(84). – P. 189–194.

STUDYING IMMOBILIZATION OF MARINE BIOLUMINESCENT BACTERIA ON HIGH-DISPERSED SILICA WITH USING TRADITIONAL AND DIGITAL TECHNOLOGIES

Shemshedinova E. Sh., Morozkina E. V., Sharokh A. A., Beytullaev A. M., Katsev A. M.

*V. I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russia
E-mail: elvisa.shemshedinova@mail.ru*

Bioluminescent systems, based on the emission response of photobacteria to the toxic factor, are widely used in various fields of biomedical research. The intrinsic luminescence of marine or recombinant bacteria is an analytical signal in these technologies and arises as a result of their vital activity. In this work, samples of photobacteria immobilized on highly dispersed silica with different numbers of bacterial cells on the solid phase of the sorbent were obtained. A quantitative assessment of the bioluminescence of the studied samples was carried out using instrumental (spectrophotometric and bioluminescent analysis) methods. It was shown that the specific luminescence of immobilized photobacteria on highly dispersed silica increases 9–13 times to specific luminescence of free photobacteria.

The possibility of estimating the luminescence intensity of samples of marine luminous bacteria *Photobacterium leiognathi* Sh1 using photographic images and subsequent computer processing using the ImageJ program was investigated.

The feasibility of using the ImageJ program in the study of the quantitative characteristics of photobacteria immobilization on VDK is shown. The data of the instrumental assessment of the intensity of bacterial luminescence (spectrophotometric and bioluminescent analysis) and the program method (the ImageJ program) correlate well with each other with high values of the correlation coefficients. The data obtained indicate the prospects for the use and improvement of non-choice methods for recording the analytical signal in bioluminescent analytical technologies.

This work was partially supported by the V. I. Vernadsky Crimean Federal University Development Program for 2015–2024 grant № БГ19/2018 and project №И/2018/16

Keywords: bioluminescent analytical technologies, *Photobacterium leiognathi* Sh1, bioluminescence, highly dispersed silica, ImageJ programs.

References

1. Deryabin D. G., *Bacterial bioluminescence: fundamental and applied aspects*, 248 p. (Science, Moscow, 2009). (in Russ).
2. Polakovič M., Švitel J., Bučko M., Filip J., Neděla V., Ansorge-Schumacher M. B., Gemeine P., Progress in biocatalysis with immobilized viable whole cells: systems development, reaction engineering and applications, *Biotechnology Letters*, **39** (5), 667, (2017).
3. Ismailov A. D., Aleskerova L. E., Photobiosensors based on luminous bacteria, *Biochemistry*, **80** (6), 867, (2015). (in Russ).
4. Morozkina E. V., Shemshedinova E. Sh., Abduramanova E. R., Katsev A. M., High dispersed silica applicability as a carrier of the biosensor sensitive element, *Scientific Notes of V. I. Vernadsky Crimean Federal University, series «Biology, chemistry»*, **4** (70), 208, (2018). (in Russ).

5. Abduramanova E. R., Naumova N. V., Derzyan L. M., Katsev A. M., Functional characteristics of free and immobilized photobacterial of Black and Azov seas, *Scientific Notes of V. I. Vernadsky Crimean Federal University, series «Biology, chemistry»*, **4** (70), 179, (2018). (in Russ).
6. Mytsik A. V., Using ImageJ software application for automated morphometry of histological studies, *Omsk Scientific Bulletin*, **2** (100), 187, (2011). (in Russ).
7. Dougherty G., *Digital image processing for medical application*, 485 p. (Cambridge University Press, Cambridge, 2009).
8. Collins T. J., ImageJ For Microscopy, *BioTechniques*, **43** (1), 25, (2007).
9. Schindelin J., Rueden C. T., Hiner M. C., Eliceiri K. W., The ImageJ Ecosystem: An Open Platform For Biomedical Image Analysis, *Mol Reprod Dev.*, **82** (7–8), 518, (2015).
10. Schneider C. A., Rasband W. S., Eliceiri K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis, *Nature Methods*, **9** (7), 671, (2012).
11. Rueden C. T., Schindelin J., Hiner M. C., DeZonia B. E., Walter A. E., Arena E. T., Eliceiri K. W., ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data, *BMC Bioinformatics*, **18** (1), 529, (2017).
12. Domínguez C., Heras J., Pascual V. IJ-OpenCV: Combining ImageJ and Open CV for processing images in biomedicine, *Computers in Biology and Medicine*, **84**, 189, (2017).

УДК 547.918:543.42:615.074

ТРИТЕРПЕНОВЫЕ САПОНИНЫ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОЙ ДОБАВКИ К ПИЩЕ НА ОСНОВЕ ПЛЮЩА

Яковишин Л. А.¹, Бажан П. И.¹, Ратников В. Д.¹, Гришковец В. И.²

¹ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет», Севастополь,
Республика Крым, Россия

²Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный
университет им. В. И. Вернадского», Симферополь, Республика Крым, Россия
E-mail: chemsevntu@rambler.ru

Установлен состав тритерпеновых сапонинов сиропа Плющ при кашле Эвалар. ТСХ-анализом показано, что в нем содержатся гликозиды олеаноловой кислоты и хедерагенина. Преобладают гликозиды, имеющие агликон хедерагенин. Наибольшее содержание отмечено для 3-*O*- α -*L*-рамнопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)-*O*- α -*L*-арабинопиранозил-28-*O*- α -*L*-рамнопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*- β -*D*-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 6)-*O*- β -*D*-глюкопиранозилового эфира хедерагенина (хедерасапонина С). В ИК-спектре сиропа наиболее интенсивны полосы поглощения колебаний связей О–Н, С=О, С=C, С–О–С и С–ОН.

Ключевые слова: тритерпеновые сапонины, плющ обыкновенный, Плющ при кашле Эвалар сироп, α -хедерин, хедерасапонин С, хедерасапонин F, ТСХ, ИК-Фурье-спектроскопия.

ВВЕДЕНИЕ

Плющ обыкновенный *Hedera helix* L. (семейство Araliaceae Juss.) издавна применяют в Европе для лечения кашля [1, 2]. На основе экстракта из его листьев разработано несколько монокомпонентных и комбинированных лекарственных препаратов [1, 3–5]. Хотя в России на данный момент плющ не относится к официальным лекарственным растениям, его препараты являются одними из наиболее популярных при лечении кашля [4, 5]. Широко используют плющ и в народной медицине [6, 7].

Наряду с лекарственными средствами, расширяется ассортимент и биологически активных добавок, содержащих экстракт плюща. В России ООО «Витаукт-пром» выпускает многокомпонентный фитокомплекс Хедерикс+, содержащий экстракты листьев мать-и-мачехи обыкновенной *Tussilago farfara* L. (Asteraceae Bercht. & J. Presl), травы тимьяна ползучего (чабреца) *Thymus serpyllum* L. (Lamiaceae Lindl.) и листьев плюща обыкновенного [8].

Недавно в продуктовой портфеле компании «Эвалар» (Россия) появились биологически активные добавки к пище на основе плюща. Это Плющ при кашле Эвалар (таблетки) и Плющ при кашле Эвалар (сироп) [9–11]. Сироп Плющ при кашле Эвалар включает сорбитовый сироп (носитель), воду очищенную, глицерин (загуститель), экстракт плюща, лимонную кислоту (регулятор кислотности), ароматизатор жидкий «Мята с травами», ксантановую камедь (загуститель), сорбат

калия (консервант). В 1 мл сиропа содержится 6 мг экстракта плюща и не менее 0,6 мг хедерасапонина С [11].

Листья плюща обыкновенного содержат тритерпеновые гликозиды [1]. Наличие данных биологически активных веществ объясняет фармакологическую активность препаратов на основе плюща [1, 12, 13]. Среди сапонинов листьев плюща преобладает тритерпеновый гликозид хедерасапонин С (гедерасапонин С, хедеракозид С, гедеракозид С, хедерозид Н₁, таурозид Н₂), представляющий собой 3-*O*- α -*L*-рамнопиранозил-(1→2)-*O*- α -*L*-арабинопиранозил-28-*O*- α -*L*-рамнопиранозил-(1→4)-*O*- β -*D*-глюкопиранозил-(1→6)-*O*- β -*D*-глюкопиранозид хедерагенина [1]. Он является пролекарственной формой главного действующего сапонина плюща α -хедерина (α -гедерина, хедерозида С, таурозида Е, 3-*O*- α -*L*-рамнопиранозил-(1→2)-*O*- α -*L*-арабинопиранозида хедерагенина). Установлено, что α -хедерин стимулирует β_2 -адренорецепторы в клетках эпителия легких и мышц бронхов. Активация β_2 -рецепторов приводит к расслаблению мышц и расширению бронхов [12, 13].

Недавно изучен комплекс тритерпеновых гликозидов фитокомплекса Хедерикс+ [14]. Об особенностях состава сапонинов сиропа Плющ при кашле Эвалар ранее не сообщалось. Поэтому в настоящей статье приведены результаты ИК-спектроскопического исследования этой биологически активной добавки, а также выделения из нее суммы тритерпеновых сапонинов и их ТСХ-анализа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использовали образец биологически активной добавки к пище Плющ при кашле Эвалар сироп 100 мл производства ЗАО «Эвалар» (Россия), свидетельство о государственной регистрации № KZ.16.01.95.003.E.000822.10.17 от 10.10.2017 г.

Получение и анализ суммы тритерпеновых сапонинов. К 1 мл средства приливали 1 мл *n*-бутанола, предварительно насыщенного водой. Смесь перемешивали в течение 15 мин и оставляли для расслоения жидкостей. Экстракцию проводили при 40 °С. Верхний (водно-спиртовой) слой отделяли и далее анализировали на наличие сапонинов методом восходящей ТСХ.

Вещества в экстракте идентифицировали с заведомыми образцами тритерпеновых сапонинов известного строения, выделенных нами ранее из листьев плющей канарского *Hedera canariensis* Willd. [15], крымского *Hedera taurica* Carr. [16] и обыкновенного *Hedera helix* L. [17, 18]. В результате в составе сиропа идентифицировали следующие тритерпеновые гликозиды: 3-*O*- α -*L*-арабинопиранозид олеаноловой кислоты (1), 3-*O*- α -*L*-арабинопиранозид хедерагенина (2), 3-*O*-сульфат олеаноловой кислоты (3), 3-*O*- α -*L*-рамнопиранозил-(1→2)-*O*- α -*L*-арабинопиранозид хедерагенина (4), 3-*O*-сульфат-28-*O*- α -*L*-рамнопиранозил-(1→4)-*O*- β -*D*-глюкопиранозил-(1→6)-*O*- β -*D*-глюкопиранозид олеаноловой кислоты (5), 3-*O*- α -*L*-рамнопиранозил-(1→2)-*O*- α -*L*-арабинопиранозил-28-*O*- α -*L*-рамнопиранозил-(1→4)-*O*- β -*D*-глюкопиранозил-(1→6)-*O*- β -*D*-глюкопиранозид олеаноловой кислоты (6) и 3-*O*- α -*L*-рамнопиранозил-(1→2)-*O*- α -*L*-арабинопиранозил-28-*O*- α -*L*-рамнопиранозил-(1→4)-*O*- β -*D*-глюкопиранозил-(1→6)-*O*- β -*D*-глюкопиранозид хедерагенина (7).

ТСХ-анализ проводили на высокоэффективных пластинках «Sorbfil» марки ПТСХ-П-В-УФ-254 с размером частиц силикагеля 8–12 мкм (тип сорбента СТХ-1ВЭ) и аналитических пластинках «Sorbfil» марки ПТСХ-П-А с размером частиц силикагеля 5–17 мкм (тип сорбента СТХ-1А, толщина слоя 90–120 мкм) («Сорбполимер», Россия). Длина пластинок 10 см. На пластинки наносили по 0,02 мл водно-бутанольного экстракта. Экстракт суммы гликозидов добавки и образцы гликозидов известного строения наносили на одну и ту же пластинку для ТСХ. Для элюирования использовали систему растворителей CHCl_3 – CH_3OH –25 % водный NH_3 (100:40:4). Хроматографировали однократно.

Таблица 1

Величины R_f сапонинов, содержащихся в сиропе Плющ при кашле Эвалар

Тритерпеновый сапонин	Величины R_f сапонинов	
	Пластика ПТСХ-П-А	Пластика ПТСХ-П-В-УФ-254
1	0,86	0,69
2	0,82	0,65
3	0,80	0,60
4	0,60	0,40
5	0,22	0,15
6	0,14	0,11
7	0,09	0,09

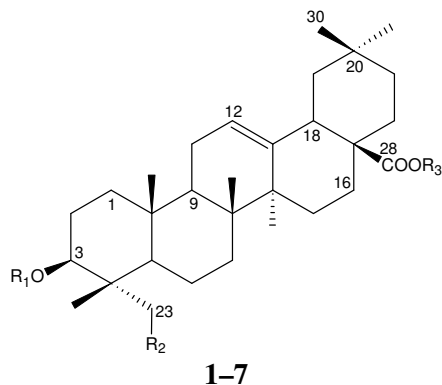
Детектирование тритерпеновых гликозидов на пластике осуществляли ранее предложенным нами реагентом, представляющим собой 0,2 % раствор *пара*-оксибензальдегида в 1 М растворе серной кислоты [19]. Хроматограммы после обработки реагентом нагревали до 100 °С при помощи нагревательного устройства для сушки пластин УСП-1М («Имид», Россия). Величины R_f сапонинов приведены в табл. 1 (для трех параллельных экспериментов; погрешность определения R_f составляет $\pm 0,01$ – $0,03$).

ИК-спектр снят на ИК-Фурье-спектрометре ФТ-801 (СИМЕКС, Россия). Для работы с ИК-спектрометром ФТ-801 использовали программу ZaIR 3.5 (СИМЕКС, Россия). Для съемки спектра сиропа использовали специальную жидкостную кювету с регулируемой толщиной слоя исследуемой жидкости (СИМЕКС, Россия). Спектры получены в области 4000–550 cm^{-1} (спектральное разрешение 4 cm^{-1} ; 50 сканов).

ИК-спектр сиропа Плющ при кашле Эвалар (ν , cm^{-1}): 3403 (ОН), 2942 (СН), 2901 (СН), 1651 (Н–О–Н, С=О, С=C), 1427 (СН), 1335 (СН), 1225 (СН), 1130 (С–О–С, С–ОН), 1082 (С–О–С, С–ОН), 1047 (С–О–С, С–ОН), 930 (моносакхаридное кольцо), 882 (СН), 685 (Н–О–Н, ОН).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Хроматографический анализ. Сапонины из сиропа извлекали н-бутанолом, насыщенным водой. Полученный бутанольный экстракт по данным ТСХ содержит несколько тритерпеновых гликозидов, обозначенных нами цифрами 1–7 (рис. 1).



Гликозид	R ₁	R ₂	R ₃
1	Arapα→	H	H
2	Arapα→	OH	H
3	⁻ O ₃ S→	H	H
4	Rhapα-(1→2)-Arapα→	OH	H
5	⁻ O ₃ S→	H	←βGlc _p -(6←1)-βGlc _p -(4←1)-αRhap
6	Rhapα-(1→2)-Arapα→	H	←βGlc _p -(6←1)-βGlc _p -(4←1)-αRhap
7	Rhapα-(1→2)-Arapα→	OH	←βGlc _p -(6←1)-βGlc _p -(4←1)-αRhap

Рис. 1. Тритерпеновые гликозиды сиропа Плющ при кашле Эвалар.

Тритерпеновые сапонины **2**, **4** и **7** идентичны по своей хроматографической подвижности и цвету пятен, соответственно, 3-*O*-α-*L*-арабинопиранозиду, 3-*O*-α-*L*-рамнопиранозил-(1→2)-*O*-α-*L*-арабинопиранозиду и 3-*O*-α-*L*-рамнопиранозил-(1→2)-*O*-α-*L*-арабинопиранозил-28-*O*-α-*L*-рамнопиранозил-(1→4)-*O*-β-*D*-глюкопиранозил-(1→6)-*O*-β-*D*-глюкопиранозиду хедерагенина. После обработки пластин для ТСХ детектирующим реагентом [19] зоны гликозидов хедерагенина имеют сине-фиолетовый цвет.

Соединения **3** и **5** представляют собой 3-*O*-сульфат олеаноловой кислоты и его 28-*O*-α-*L*-рамнопиранозил-(1→4)-*O*-β-*D*-глюкопиранозил-(1→6)-*O*-β-*D*-глюкопиранозильный эфир (хедерасопонин F). Среди сульфатов преобладает гликозид **5**. Пятна сульфатированных соединений ярко-розового цвета проявляются при нагревании ТСХ-пластинок, обработанных реагентом [19], в первую очередь [20].

Тритерпеновые гликозиды **1** и **6** были идентифицированы как 3-*O*-α-*L*-арабинопиранозид и 3-*O*-α-*L*-рамнопиранозил-(1→2)-*O*-α-*L*-арабинопиранозил-28-

O- α -*L*-рамнопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*- β -*D*-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 6)-*O*- β -*D*-глюкопиранозид олеаноловой кислоты. При этом преобладает гликозид **6**. Пятна гликозидов олеаноловой кислоты на хроматограммах имеют розовый цвет.

В составе сиропа преобладают тритерпеновые сапонины, агликоном которых является хедерагенин, т.к. пятна соответствующих гликозидов на хроматограммах имели наибольшую площадь. Повышенное содержание отмечено для тритерпеновых гликозидов **4** (α -хедерин), **5** (хедерасапонин F) и **7** (хедерасапонин C). Гликозид **7** является доминирующим среди всех сапонинов сиропа. В составе лекарственных препаратов от кашля Проспан сироп [20], Геделикс капли [21, 22] и Пектолван плющ сироп [23] гликозид **7** так же имеет наибольшее содержание. Таким образом, по разнообразию тритерпеновых гликозидов сироп Плющ при кашле Эвалар существенно не отличается от известных лекарственных средств на основе листьев плюща.

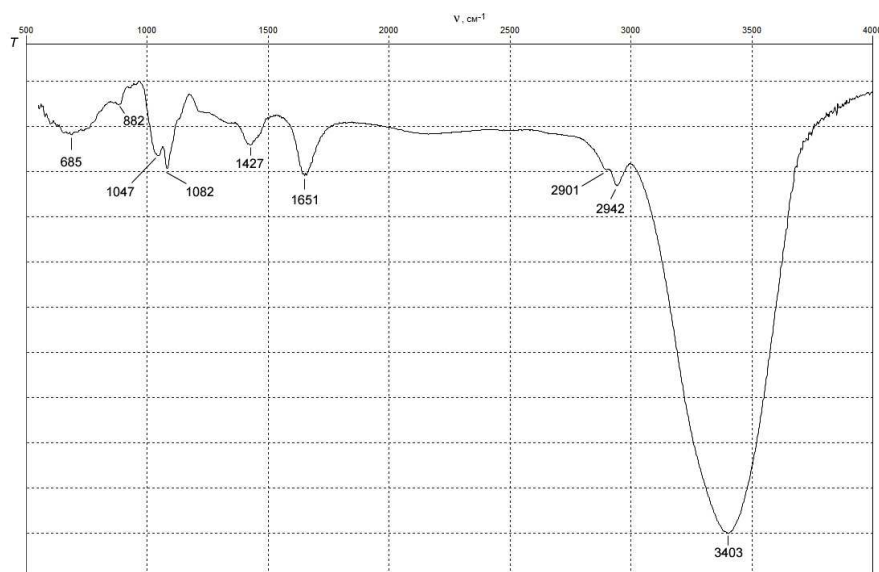


Рис. 2. ИК-спектр сиропа Плющ при кашле Эвалар.

ИК-спектроскопический анализ. Наличие в составе сиропа многоатомных спиртов, воды, суммы тритерпеновых сапонинов и прочих компонентов определяют вид его ИК-спектра. В ИК-спектре сиропа (рис. 2) наблюдается широкая интенсивная полоса валентных колебаний ОН-связей при 3403 см⁻¹. Полосы валентных колебаний связей СН находятся при 2942 и 2901 см⁻¹. При 1427, 1335 и 1225 см⁻¹ найдены полосы поглощения деформационных колебаний СН-связей. Полосы поглощения валентных колебаний связей С–О в группах С–ОН и С–О–С обнаружены при 1082 и 1047 см⁻¹. Полоса 1082 см⁻¹ более интенсивна, что ранее так же наблюдалось в ИК-спектре лекарственного средства Проспан сироп от кашля [24].

Полоса поглощения 1651 см^{-1} отнесена к деформационным колебаниям молекул воды и валентным колебаниям связей $\text{C}=\text{O}$ и $\text{C}=\text{C}$. Широкая полоса, отнесенная к неплоским деформационным колебаниям ассоциированных связей $\text{O}-\text{H}$ органических составляющих добавки и деформационным колебаниям воды, найдена при 685 см^{-1} .

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Из биологически активной добавки к пище Плющ при кашле Эвалар сироп выделена сумма тритерпеновых сапонинов и проведен ее ТСХ-анализ. Идентифицированы основные сапонины препарата, среди которых преобладают гликозиды хедерагенина.
2. Наибольшее содержание отмечено для 3-*O*- α -*L*-рамнопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)-*O*- α -*L*-арабинопиранозил-28-*O*- α -*L*-рамнопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*- β -*D*-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 6)-*O*- β -*D*-глюкопиранозилового эфира хедерагенина (хедерасапонина С).
3. В ИК-спектре сиропа наиболее интенсивные полосы поглощения находятся при 3403 см^{-1} (валентные колебания $\text{O}-\text{H}$), 1651 см^{-1} (деформационные колебания $\text{H}-\text{O}-\text{H}$, валентные колебания $\text{C}=\text{O}$ и $\text{C}=\text{C}$), 1082 и 1047 см^{-1} (валентные колебания $\text{C}-\text{O}$ в $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ и $\text{C}-\text{OH}$), а также 685 см^{-1} (деформационные колебания $\text{H}-\text{O}-\text{H}$ и $\text{O}-\text{H}$).

Список литературы

1. Hostettmann K. Saponins / K. Hostettmann, A. Marston. – Cambridge: Cambridge University Press, 1995. – 548 p.
2. Зузук Б. М. Плющ выюющийся *Hedera helix* L. (аналитический обзор) / Б. М. Зузук, Р. В. Куцик, Л. И. Зузук // Провизор. – 2003. – № 12. – С. 13–14.
3. Луценко Ю. О. Маркетингові та фармакоеконімічні дослідження ринку лікарських засобів України на основі плюща звичайного / Ю. О. Луценко, Г. Д. Гасюк, Р. Є. Дармограй // Клініч. фармац., фармакотер. та мед. стандартиз. – 2009. – № 1–2. – С. 170–174.
4. Розничный рынок препаратов для устранения симптомов простуды и кашля (R05) в России и странах СНГ // Ремедиум. – 2007. – № 8. – С. 62–64.
5. Прожерина Ю. Место современных фитопрепаратов в терапии кашля / Ю. Прожерина // Ремедиум. – 2018. – № 10. – С. 17–19.
6. Лавренов В. К. Энциклопедия лекарственных растений народной медицины / В. К. Лавренов, Г. В. Лавренова. – СПб.: Издательский дом «Нева», 2003. – 272 с.
7. Осетров В. Д. Альтернативная фитотерапия / В. Д. Осетров – К.: Наукова думка, 1993. – 224 с.
8. Хедерикс+ (Hederix+). Инструкция по применению фитокомплекса. ООО «Витаукт-пром» (Россия), свидетельство о государственной регистрации № RU.77.99.11.003.E.046250.11.11 от 04.11.2011.
9. Сироп и таблетки «Плющ при кашле Эвалар»: выбор за вами! [Электронный ресурс]. URL: <https://www.evalar.ru/news/item/sirop-i-tabletki-plyushch-pri-kashle-evalar-vybor-za-vami/> (дата обращения: 30.11.2019).
10. Плющ при кашле Эвалар [Электронный ресурс]. URL: <https://shop.evalar.ru/catalog/item/ivy-coughs-colds/> (дата обращения: 30.11.2019).
11. Плющ при кашле Эвалар сироп [Электронный ресурс]. URL: <https://shop.evalar.ru/catalog/item/ivy-cough-syrup-vitamins/> (дата обращения: 30.11.2019).

12. α -Hederin, but not hederacoside C and hederagenin from *Hedera helix*, affects the binding behavior, dynamics, and regulation of β_2 -adrenergic receptors / A. Sieben, L. Prenner, T. Sorkalla [et al.] // Biochemistry. – 2009. – Vol. 48, № 15. – P. 3477–3482.
13. Boltshauser V. Wirkmechanismus von efeu entschlüsselt. Efeusaponine entfalten eine β -adrenerge Wirkung in den Atemwegen / V. Boltshauser // Phytotherapie. – 2006. – № 4. – S. 20–22.
14. Яковишин Л. А. Сапонины фитокомплекса «Хедерикс+» / Л. А. Яковишин, В. И. Гришковец, Е. Н. Корж // Ученые записки Крымского федерального университета им. В. И. Вернадского. Биология. Химия. – 2015. – Т. 1 (67), № 4. – С. 163–169.
15. Тритерпеновые гликозиды *Hedera canariensis* I. Строение гликозидов L-A, L-B₁, L-B₂, L-C, L-D, L-E₁, L-G₁, L-G₂, L-G₃, L-G₄, L-H₁, L-H₂ и L-I₁ из листьев *Hedera canariensis* / В. И. Гришковец, Д. Ю. Сидоров, Л. А. Яковишин [и др.] // Химия природ. соедин. – 1996. – № 3. – С. 377–383.
16. Тритерпеновые гликозиды *Hedera taurica* I. Строение таурозида Е из листьев *Hedera taurica* / А. С. Шашков, В. И. Гришковец, А. А. Лолойко [и др.] // Химия природ. соедин. – 1987. – № 3. – С. 363–366.
17. Тритерпеновые гликозиды *Hedera helix* I. Строение гликозидов L-1, L-2a, L-2b, L-3, L-4a, L-4b, L-6a, L-6b, L-6c, L-7a и L-7b из листьев плюща обыкновенного / В. И. Гришковец, А. Е. Кондратенко, Н. В. Толкачева [и др.] // Химия природ. соедин. – 1994. – № 6. – С. 742–746.
18. Тритерпеновые гликозиды *Hedera helix* III. Строение тритерпеновых сульфатов и их гликозидов / В. И. Гришковец, А. Е. Кондратенко, А. С. Шашков, В. Я. Чирва // Химия природ. соедин. – 1999. – № 1. – С. 87–90.
19. Яковишин Л. А. Детектирующие реагенты для ТСХ тритерпеновых гликозидов / Л. А. Яковишин // Химия природ. соедин. – 2003. – № 5. – С. 419–420.
20. Исследование тритерпеновых гликозидов лекарственного препарата проспан® / Л. А. Яковишин, М. А. Вожжова, А. Л. Кузнецова, В. И. Гришковец // Журн. орг. и фарм. химии. – 2005. – Т. 3, вып. 1 (9). – С. 57–59.
21. Яковишин Л. А. Комплекс тритерпеновых гликозидов лекарственного препарата Hedelix® / Л. А. Яковишин, В. И. Гришковец // Химия природ. соедин. – 2003. – № 5. – С. 417–418.
22. Визначення тритерпенових глікозидів у препараті «Геделікс» за допомогою тонкошарової хроматографії / Л. О. Яковішин, Г. Л. Кузнецова, М. А. Рубінсон, О. М. Корж // Фармац. журн. – 2006. – № 6. – С. 62–65.
23. Яковішин Л. О. Тритерпенові глікозиди лікарського препарату «Пектолван плющ» / Л. О. Яковішин, В. І. Гришковець, О. М. Корж // Фармац. журн. – 2010. – № 3. – С. 56–60.
24. Яковишин Л. А. Лекарственные препараты на основе плюща: ИК-Фурье-спектроскопический анализ / Л. А. Яковишин, П. И. Бажан, В. Д. Ратников, В. И. Гришковец // Ученые записки Крымского федерального университета им. В. И. Вернадского. Биология. Химия. – 2019. – Т. 5 (71), № 3. – С. 259–267.

TRITERPENE SAPONINS OF BIOLOGICALLY ACTIVE FOOD ADDITIVE BASED ON IVY

Yakovishin L. A.¹, Bazhan P. I.¹, Ratnikov V. D.¹, Grishkovets V. I.²

¹Sevastopol State University, Sevastopol, Crimea, Russia

²V. I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russia

E-mail: chemsevtu@rambler.ru

Ivy leaves *Hedera helix* L. (Araliaceae Juss.) have been used in officinal and folk medicine. It is known that ivy contains triterpene glycosides. Triterpene glycosides explain the pharmacological effect of ivy and drugs based on its.

Recently, a biologically active food additive Ivy at cough Evalar syrup (Evalar, Russia) has appeared. It includes ivy extract and other components.

Triterpene saponins extracted from Ivy at cough Evalar syrup with water-saturated *n*-butanol. The *n*-butanol extract was analyzed by TLC. According to TLC, it contained several groups of saponins. The saponins of Ivy at cough Evalar syrup were identified using authentic specimens of triterpene glycosides of known structure that we isolated from leaves of Canary ivy *Hedera canariensis* Willd., common ivy *Hedera helix* L. and Crimean ivy *Hedera taurica* Carr.

By TLC analysis, were identified oleanolic acid 3-*O*-sulfate, 3-*O*-sulfate-28-*O*- α -*L*-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*- β -*D*-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-*O*- β -*D*-glucopyranoside (hederasaponin F), 3-*O*- α -*L*-arabinopyranoside, and 3-*O*- α -*L*-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-*O*- α -*L*-arabinopyranosyl-28-*O*- α -*L*-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*- β -*D*-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-*O*- β -*D*-glucopyranoside, as well as hederagenin 3-*O*- α -*L*-arabinopyranoside, 3-*O*- α -*L*-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-*O*- α -*L*-arabinopyranoside (α -hederin), and 3-*O*- α -*L*-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-*O*- α -*L*-arabinopyranosyl-28-*O*- α -*L*-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*- β -*D*-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-*O*- β -*D*-glucopyranoside (hederasaponin C). In the syrup are dominated hederagenin glycosides. The highest content was observed for hederasaponin C.

In the IR spectrum of the syrup, the most intense absorption bands are at 3403 cm⁻¹ (O–H stretching vibrations), 1651 cm⁻¹ (H–O–H bending vibrations, C=O and C=C stretching vibrations), 1082 and 1047 cm⁻¹ (C–O stretching vibrations in C–O–C and C–OH), as well as 685 cm⁻¹ (H–O–H and O–H bending vibrations).

Keywords: triterpene saponins, common ivy, Ivy at cough Evalar syrup, α -hederin, hederasaponin C, hederasaponin F, TLC, FT-IR spectroscopy.

References

1. Hostettmann K., Marston A., *Saponins*, 548 p. (Cambridge University Press, Cambridge, 1995).
2. Zuzuk B. M., Kutsik R. V., Zuzuk L. I., Ivy creeping *Hedera helix* L. (analytical review), *Provizor*, 12, 13 (2003). (in Russ.).
3. Lutsenko Yu. O., Gasjuk A. D., Darmohray R. Ye., Marketing and pharmacoeconomic investigations of the medicines, based on the *Hedera helix* content, in ukrainian market, *Clinic. Pharm., Pharmacother. & Med. Standardiz.*, 1–2, 170 (2009). (in Ukr.).
4. The retail market for drugs to eliminate the symptoms of colds and cough (R05) in Russia and CIS countries, *Remedium*, 8, 62 (2007). (in Russ.).
5. Prozherina J., The role of modern herbal remedies in the management of cough, *Remedium*, 10, 17 (2018). (in Russ.).
6. Lavrenov V. K., Lavrenova G. V., *Encyclopedia of medicinal plants of traditional medicine*, 272 p. (Publishing House "Neva", St. Petersburg, 2003). (in Russ.).
7. Osetrov V. D., *Alternative herbal medicine*, 224 p. (Naukova Dumka, Kiev, 1993). (in Russ.).
8. *Hederix+*, *Instructions for use of phytocomplex*, Vitauct-prom (Russia), certificate of state registration № RU.77.99.11.003.E.046250.11.11 on 04.11.2011. (in Russ.).
9. *Syrup and tablets "Ivy at cough Evalar": the choice is yours!*, <https://www.evalar.ru/news/item/sirop-i-tabletki-plyushch-pri-kashle-evalar-vybor-za-vami/> (Accessed November 30, 2019). (in Russ.).
10. *Ivy at cough Evalar*, <https://shop.evalar.ru/catalog/item/ivy-coughs-colds/> (Accessed November 30, 2019). (in Russ.).
11. *Ivy at cough Evalar syrup*, <https://shop.evalar.ru/catalog/item/ivy-cough-syrup-vitamins/> (Accessed November 30, 2019). (in Russ.).

12. Sieben A., Prenner L., Sorkalla T., Wolf A., Jakobs D., Runkel F., Häberlein H., α -Hederin, but not hederacoside C and hederagenin from *Hedera helix*, affects the binding behavior, dynamics, and regulation of β_2 -adrenergic receptors, *Biochemistry*, **48** (15), 3477 (2009).
13. Boltshauser V., Wirkmechanismus von efeu entschlüsselt. Efeusaponine entfalten eine β -adrenerge Wirkung in den Atemwegen, *Phytotherapie*, 4, 20 (2006).
14. Yakovishin L. A., Grishkovets V. I., Korzh E. N., Saponins of the phytocomplex Hederix+, *Scientific Notes of V. I. Vernadsky Crimean Federal University. Biology. Chemistry*, **1** (4) 163 (2015). (in Russ.).
15. Grishkovets V. I., Sidorov D. Yu., Yakovishin L. A., Arnautov N. N., Shashkov A. S., Chirva V. Ya., Triterpene glycosides of *Hedera canariensis* I. Structures of glycosides L-A, L-B₁, L-B₂, L-C, L-D, L-E₁, L-G₁, L-G₂, L-G₃, L-G₄, L-H₁, L-H₂, and L-I₁ from the leaves of *Hedera canariensis*, *Khim. Prirod. Soedin.*, 3, 377 (1996). (in Russ.).
16. Shashkov A. S., Grishkovets V. I., Loloyko A. A., Chirva V. Ya., Triterpene glycosides of *Hedera taurica* I. Structure of tauroside E from the leaves of *Hedera taurica*, *Khim. Prirod. Soedin.*, 3, 363 (1987). (in Russ.).
17. Grishkovets V. I., Kondratenko A. E., Tolkacheva N. V., Shashkov A. S., Chirva V. Ya., Triterpene glycosides of *Hedera helix* I. The structures of glycosides L-1, L-2a, L-2b, L-3, L-4a, L-4b, L-6a, L-6b, L-6c, L-7a, and L-7b from the leaves of common ivy, *Khim. Prirod. Soedin.*, 6, 742 (1994). (in Russ.).
18. Grishkovets V. I., Kondratenko A. E., Shashkov A. S., Chirva V. Ya., Triterpene glycosides of *Hedera helix* III. Structure of the triterpene sulfates and their glycosides, *Khim. Prirod. Soedin.*, 1, 87 (1999). (in Russ.).
19. Yakovishin L. A., Developers for TLC of triterpene glycosides, *Khim. Prirod. Soedin.*, 5, 419 (2003). (in Russ.).
20. Yakovishin L. A., Vozhzhova M. A., Kuznetsova A. L., Grishkovets V. I., Study of triterpene glycosides of the drug prospan®, *Zhurn. Org. Farm. Khim.*, **3** (1), 57 (2005). (in Russ.).
21. Yakovishin L. A., Grishkovets V. I., Triterpene glycosides of the medicinal preparation Hedelix®, *Khim. Prirod. Soedin.*, 5, 417 (2003). (in Russ.).
22. Yakovishin L. A., Kuznetsova A. L., Rubinson M. A., Korzh E. N., Determination of the triterpene glycosides in the medicinal preparation hedelix by TLC, *Farm. Zhurn.*, 6, 62 (2006). (in Ukr.).
23. Yakovishin L. A., Grishkovets V. I., Korzh E. N., Triterpene glycosides of the medicinal preparation "Pectolvan Hedera helix", *Pharm. Zhurn.*, 3, 56 (2010). (in Ukr.).
24. Yakovishin L. A., Bazhan P. I., Ratnikov V. D., Grishkovets V. I., Ivy-containing drugs: FT-IR spectroscopy analysis, *Scientific Notes of V. I. Vernadsky Crimean Federal University. Biology. Chemistry*, **5** (3) 259 (2019). (in Russ.).

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Александрова Дарья Дмитриевна	ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет ИТМО», химико-биологический кластер, магистр I курса
Бажан Полина Игоревна	ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет», студентка 4 курса
Бажин Владислав Юрьевич	Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского», старший лаборант кафедры общей и физической химии.
Бейтуллаев Асан Марленович	Медицинская академия имени С. И. Георгиевского (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского», студент 2 курса кафедры медицинской и фармацевтической химии
Бобкова Елена Николаевна	Смоленская государственная академия физической культуры, спорта и туризма, кандидат педагогических наук, доцент, проректор по научной работе и международной деятельности, e-mail: helenbobkova@mail.ru
Богач Ирина Николаевна	Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского», аспирант, кафедра теории и методики адаптивной физической культуры, физической реабилитации и оздоровительных технологий
Большакова Анна Александровна	Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского», обучающаяся 1 курса магистратуры при кафедре биохимии
Бугара Игорь Александрович	Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского», кандидат биологических наук, доцент кафедры ботаники и физиологии и биотехнологий, доцент
Буденкова Екатерина Александровна	Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Институт живых систем, лаборант, e-mail: KBudenkova@gmail.com
Ваколюк Ирина Анатольевна	Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Институт живых систем, кандидат биологических наук, доцент, преподаватель, e-mail: IVakoliuk@kantiana.ru

Воровский Сергей Николаевич	Медицинская академия имени С. И. Георгиевского (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского», кандидат медицинских наук, доцент, доцент кафедры хирургии
Вохминцев Андрей Петрович	Тюменский государственный медицинский университет, преподаватель кафедры медицинской информатики и биологической физики с сетевой секцией биоэтики ЮНЕСКО, e-mail: 646224@mail.ru
Вяткина Оксана Валерьевна	Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского», кандидат химических наук, доцент кафедры общей и физической химии, e-mail: oksana_vyatkina@list.ru
Ганусяк Анжела Петровна	Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского», обучающаяся по программе подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре (аспирантка) кафедры экологии и зоологии факультета биологии и химии, e-mail: golden-1392@mail.ru
Гладков Евгений Александрович	Московский физико-технический институт (государственный университет), кандидат биологических наук, доцент кафедры нано-, био-, информационных и когнитивных технологий (НБИК), Институт физиологии растений Российской Академии Наук, старший научный сотрудник группы специализированного метаболизма корней, e-mail: gladkovu@mail.ru
Горелова Виктория Валерьевна	ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма», младший научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной биологии
Городничев Руслан Михайлович	Великолукская государственная академия физической культуры и спорта, доктор биологических наук, проректор по НИР, e-mail: gorodnichev@vlgafo.ru
Гришковец Владимир Иванович	Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского», доктор химических наук, профессор кафедры общей и физической химии
Гусев Алексей Николаевич	Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского», доктор химических наук, профессор кафедры общей и физической химии, e-mail: galex0330@rambler.ru

Дубинин Геннадий Васильевич	Смоленская государственная академия физической культуры, спорта и туризма, кандидат педагогических наук, профессор кафедры теории методики легкой атлетики, e-mail: legkoatletsgafkst@mail.ru
Елкина Наталья Маратовна	Медицинская академия имени С. И. Георгиевского (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского», кандидат биологических наук, преподаватель подготовительных курсов
Загноенко Наталья Евгеньевна	Медицинская академия имени С. И. Георгиевского (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского», выпускница
Звягина Екатерина Владимировна	Уральский государственный университет физической культуры, кандидат педагогических наук, доцент кафедры физиологии
Зуевская Татьяна Валерьевна	Ханты-Мансийская государственная медицинская академия, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой пропедевтики внутренних болезней и факультетской терапии, e-mail: z-alnair@mail.ru
Кадочникова Виктория Игоревна	Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского», факультет биологии и химии, кафедра ботаники и физиологии растений и биотехнологий, бакалавр 5 курса заочной формы обучения
Казакова Вера Валентиновна	Медицинская академия имени С. И. Георгиевского (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского», кандидат биологических наук, доцент кафедры медицинской биологии
Кацев Андрей Моисеевич	Медицинская академия имени С. И. Георгиевского (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского», доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой медицинской и фармацевтической химии, e-mail: katsev@mail.ru
Коба Владимир Петрович	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН», доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией дендрологии, e-mail: kobavp@mail.ru
Коломисц Ольга Ивановна	Уральский государственный университет физической культуры, профессор кафедры спортивной медицины и физической реабилитации, кандидат биологических наук, доцент

Коношенко Светлана Владимировна	Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского», доктор биологических наук, профессор кафедры биохимии
Корень Иван Иванович	Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского», доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры физиологии человека и животных и биофизики, e-mail: ikoreniuk@yandex.ru
Корж Елена Николаевна	ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет», кандидат химических наук, доцент, доцент кафедры «Химия и химические технологии».
Крыжко Анастасия Владимировна	ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма», кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики, протеомики и биоинформатики в сельском хозяйстве
Кузнецова Людмила Николаевна	ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма», кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной биологии
Латюшин Ян Витальевич	Уральский государственный университет физической культуры, профессор кафедры физиологии, доктор биологических наук
Литвин Федор Борисович	Смоленская государственная академия физической культуры, спорта и туризма, доктор биологических наук, профессор кафедры биологических дисциплин
Минина Елена Николаевна	Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», кандидат биологических наук, доцент кафедры теории и методики адаптивной физической культуры, физической реабилитации и оздоровительных технологий
Михайлова Екатерина Алексеевна	Великолукская государственная академия физической культуры и спорта, кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии и спортивной медицины, e-mail: together-mm@yandex.ru
Моисеев Сергей Александрович	Научно-исследовательский институт проблем спорта и оздоровительной физической культуры Великолукской государственной академии физической культуры и спорта, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник, e-mail: sergey_moiseev@vlgafo.ru

Морозкина Екатерина Владимировна	Медицинская академия имени С. И. Георгиевского (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского», кандидат химических наук, ассистент кафедры медицинской и фармацевтической химии, e-mail: emorozkina@mail.ru
Начарова Маргарита Александровна	Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского», обучающаяся 1-го курса аспирантуры по направлению подготовки 06.06.01 Биология
Никифорова Екатерина Вячеславовна	Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского», выпускница магистратуры по направлению подготовки 06.04.01 Биология
Норкин Антон Сергеевич	Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского», магистрант 1 курса кафедры общей и физической химии
Омельченко Александр Владимирович	Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», кандидат биологических наук, доцент кафедры ботаники и физиологии и биотехнологий
Панов Денис Алесксандрович	Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», кандидат химических наук, доцент кафедры общей и физической химии факультета биологии и химии, e-mail: despanov@gmail.com
Папельбу Владимир Владимирович	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН», научный сотрудник лаборатории лесоведения ФГБУН «НБС-ННЦ РАН», e-mail: Serb_84@mail.ru
Парамонова Алина Константиновна	Донецкий национальный университет, студент-магистрант кафедры физиологии человека и животных, e-mail: gal_alex_frolova@mail.ru
Петров Иван Михайлович	Тюменский государственный медицинский университет, доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой медицинской информатики и биологической физики с сетевой секцией биоэтики ЮНЕСКО, e-mail: petrovtokb@mail.ru
Петрушкина Надежда Петровна	Уральский государственный университет физической культуры, доктор медицинских наук, старший научный сотрудник, зав. кафедрой физиологии

Пискунов Иван Васильевич	Великолукская государственная академия физической культуры и спорта, преподаватель кафедры теории и методики легкой атлетики, e-mail: ivan-acdc@rambler.ru
Пищурова Вероника Сергеевна	Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», обучающаяся 2 курса магистратуры кафедры экологии и зоологии факультета биологии и химии, e-mail: greench12@yandex.ru
Плугатарь Юрий Владимирович	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН», директор, заведующий отделом дендрологии, цветоводства и ландшафтной архитектуры, доктор сельскохозяйственных наук, чл.-корр. РАН, e-mail: priemnaya-nbs-nnc@yandex.ru
Придатко Алена Игоревна	Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», аспирант кафедры физиологии человека и животных и биофизики
Просяникова Ирина Борисовна	Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», кандидат биологических наук, доцент кафедры ботаники и физиологии растений и биотехнологий
Раваева Марина Юрьевна	Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии человека и животных и биофизики
Ратников Владимир Дмитриевич	ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет», студента 4 курса
Симагина Наталья Олеговна	Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского», кандидат биологических наук, доцент кафедры экологии и зоологии факультета биологии и химии, e-mail: nsimagina@list.ru
Соболев Валерий Иванович	Институт педагогики, психологии и инклюзивного образования Гуманитарно-педагогической академии (филиал) Крымского федерального университета им. В. И. Вернадского, доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры здоровья и реабилитации, e-mail: v.sobolev@mail.ru
Соловьева Александра Ивановна	Институт физиологии растений Российской Академии Наук, научный сотрудник группы специализированного метаболизма корней, кандидат биологических наук, e-mail: alexandras85@mail.ru

Соловьева Светлана Владимировна	Тюменский государственный медицинский университет, доктор медицинских наук, доцент, заведующая кафедрой биологии, e-mail: svsolov@mail.ru
Степанова Анна Юрьевна	Институт физиологии растений Российской Академии Наук, кандидат биологических наук, заведующая группой специализированного метаболизма корней, e-mail: step_ann@mail.ru
Сытников Денис Михайлович	Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Биотехнологического научно-учебного центра, e-mail: sytnikov@list.ru
Ташлиева Илина Игоревна	Институт физиологии растений Российской Академии Наук, научный сотрудник лаборатории биологии культивируемых клеток, e-mail: ii_tash@mail.ru
Трубицын Михаил Александрович	Белгородский государственный национальный исследовательский университет, кандидат технических наук, доцент, профессор кафедры общей химии, e-mail: troubitsin@bsu.edu.ru.
Труш Вера Владимировна	Донецкий национальный университет, кандидат медицинских наук, доцент, зав. кафедрой физиологии человека и животных
Фролова Галина Александровна	Донецкий национальный университет, кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии человека и животных, e-mail: gal_alex_frolova@mail.ru
Фурда Любовь Владимировна	Белгородский государственный национальный исследовательский университет, кандидат химических наук, доцент кафедры общей химии, e-mail: furda@bsu.edu.ru
Харина Ирина Федоровна	Уральского государственного университета физической культуры, научный сотрудник НИИ Олимпийского спорта, кандидат педагогических наук, доцент, доцент кафедры анатомии
Хоанг Вьет Хунг	Белгородский государственный национальный исследовательский университет, аспирант кафедры общей химии, e-mail: hung.hoangviet191290@gmail.com
Хусаинов Денис Рашидович	Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии человека и животных и биофизики. ГБПОУ «Крымское среднее профессиональное училище (техникум) олимпийского резерва», преподаватель, e-mail: gangliu@yandex.ru

Черетаев Игорь Владимирович	Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии человека и животных и биофизики, e-mail: cheretaev86@yandex.ru
Четверик Анастасия Владимировна	Донецкий национальный университет, студент-магистрант кафедры физиологии человека и животных, e-mail: gal_alex_frolova@mail.ru
Чуян Елена Николаевна	Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», доктор биологических наук, профессор кафедры физиологии человека и животных и биофизики
Шарох Антон Анатольевич	Медицинская академия имени С. И. Георгиевского (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского», студент 4 курса кафедры медицинской и фармацевтической химии
Шейко Елена Анатольевна	Медицинская академия имени С. И. Георгиевского (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского», кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии, e-mail: lenasheyko@mail.ru
Шейх-Заде Мамет-Исмет	ГБОУВО РК КИПУ «Крымский инженерно-педагогический университет», кандидат физико-математических наук, доцент кафедры «Электромеханика и сварка», e-mail: ems@kipu-rc.ru
Шемшединова Эльвиса Шавкатовна	Медицинская академия имени С. И. Георгиевского (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского», ассистент кафедры медицинской и фармацевтической химии, e-mail: elvisa.shemshedanova@mail.ru
Шульгин Виктор Фёдорович	Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой общей и физической химии, e-mail: shulvic@gmail.com
Эйсмонт Евгения Владимировна	Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии человека и животных и биофизики
Юркова Ирина Николаевна	ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского», кандидат технических наук, старший научный сотрудник научного отдела Ботанического сада, e-mail: nanosilver@rambler.ru

**Яковишин
Леонид Александрович**

ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»,
кандидат химических наук, доцент, заведующий кафедрой
«Химия», e-mail: chemsevntu@rambler.ru

**Ярош
Ольга Борисовна**

Институт экономики и управления ФГАОУ ВО «Крымский
федеральный университет им В. И. Вернадского», профессор
кафедры маркетинга, торгового и таможенного дела,
руководитель проекта Лаборатория нейромаркетинга и
поведенческой экономики, доктор экономических наук, доцент,
e-mail: iarosh.olga@gmail.com

СОДЕРЖАНИЕ

БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

Буденкова Е. А., Ваколюк И. А.

СКОРОСТЬ И ТОЧНОСТЬ ЗРИТЕЛЬНО ВЫЗВАННЫХ САККАД У
ДЕТЕЙ 2–9 ЛЕТ 3

Вохминцев А. П., Соловьева С. В., Петров И. М., Зуевская Т. В.

ДИНАМИКА ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ
СИСТЕМЫ ЖИТЕЛЕЙ ХМАО - ЮГРЫ В ПРОЦЕССЕ УПОТРЕБЛЕНИЯ
ПРИРОДНЫХ ЦЕОЛИТОВ 13

Ганусяк А. П., Симагина Н. О., Пищурова В. С.

ХАРАКТЕРИСТИКА АЛЛЕЛОПАТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
ВОДОРАСТВОРИМЫХ ВЕЩЕСТВ *HALIMIONE VERRUCIFERA* (M.BIEB.) AELLEN
ПРИ ТЕРМИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ 22

Коношенко С. В., Большакова А. А., Елкина Н. М., Казакова В. В., Загноенко Н. Е.

РОЛЬ ТЕМПЕРАТУРНОГО ФАКТОРА В ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ
ПРОТЕИНОВ И МЕТГЕМОГЛОБИНООБРАЗОВАНИИ В ЭРИТРОЦИТАХ В
УСЛОВИЯХ РАЗВИТИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА 33

Крыжко А. В., Бугара И. А., Омельченко А. В., Кузнецова Л. Н., Горелова В. В.

АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ СУСПЕНЗИОННЫХ КУЛЬТУР КАТРАНА
ПРИМОРСКОГО (*CRAMBE MARITIMA* L.) ОТНОСИТЕЛЬНО ШТАММОВ
ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ *BACILLUS THURINGIENSIS* 41

Латюшин Я. В., Петрушкина Н. П., Звягина Е. В., Воровский С. Н., Харина И. Ф.

ОЦЕНКА ПСИХОФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ СТУДЕНТОВ-
СПОРТСМЕНОВ ПО ПОКАЗАТЕЛЯМ КОНЦЕНТРАЦИИ ВНИМАНИЯ И
АДАПТАЦИОННОГО ПОТЕНЦИАЛА 50

Литвин Ф. Б.

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ КРОВИ И
ТКАНЕВОЙ МЕТАБОЛИЗМ ПРИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПРОБАХ У
ВЕЛОСИПЕДИСТОВ ВМХ 61

Минина Е. Н., Богач И. Н.

ВЫЯВЛЕНИЕ ВОЗРАСТНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ АКТИВАЦИИ
САНОГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ У ШКОЛЬНИКОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ФАКТОРНОГО АНАЛИЗА И МАТЕМАТИЧЕСКОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ 69

Моисеев С. А., Михайлова Е. А., Пискунов И. В., Бобкова Е. Н., Дубинин Г. В.,

Городничев Р. М.

ОСОБЕННОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ ПРОЦЕССОВ УПРАВЛЕНИЯ
СКЕЛЕТНЫМИ МЫШЦАМИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ЛОКОМОЦИЯХ РАЗЛИЧНОЙ
ИНТЕНСИВНОСТИ 79

Петрушкина Н. П., Коломиец О. И., Латюшин Я. В., Воровский С. Н., Звягина Е. В.

ИНФОРМАТИВНОСТЬ ПОКАЗАТЕЛЕЙ, ХАРАКТЕРИЗУЮЩИХ ВЕГЕТАТИВНЫЙ
СТАТУС СПОРТСМЕНА ПРИ МЫШЕЧНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ 91

Плугатарь Ю. В., Коба В. П., Папельбу В. В. НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ФИТОЦЕНОЗОВ <i>PINUS PALLASIANA</i> D. DON НИКИТСКОГО ХРЕБТА.....	102
Просянкина И. Б., Кадочникова В. И. ФИТОТРОФНЫЕ ОБЛИГАТНО-ПАРАЗИТНЫЕ МИКРОМИЦЕТЫ ЦЕЛИННОГО СТЕПНОГО УЧАСТКА ОКРЕСТНОСТЕЙ С. ЯСТРЕБКИ НИЖНЕГОРСКОГО РАЙОНА РЕСПУБЛИКИ КРЫМ	111
Раваева М. Ю., Чуян Е. Н., Черетаев И. В., Придатко А. И., Шульгин В. Ф. ПОКАЗАТЕЛИ КАРДИОРЕСПИРАТОРНОЙ СИСТЕМЫ КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ СПЕЙСЕРИРОВАННОГО КОМПЛЕКСА БИС(2-ПИРИДИЛ)-3-(1,2,4- ТРИАЗОЛИЛ)ПРОПАНА И 11-ГИДРОКСИ-1,1-ЭТИЛИДЕНДИФОСФОНОВОЙ КИСЛОТЫ	124
Степанова А. Ю., Соловьева А. И., Ташлиева И. И., Гладков Е. А. ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К МЕДИ (КАК К НЕБЛАГОПРИЯТНОМУ ЭКОЛОГИЧЕСКОМУ ФАКТОРУ) И ОКИСЛИТЕЛЬНЫМ СТРЕССОМ НА ПРИМЕРЕ КАЛЛУСОВ ЛЬНА МНОГОЛЕТНЕГО (<i>LINUM PERENNE</i> L.)	137
Сытников Д. М., Шейко Е. А. ОСОБЕННОСТИ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА И УЛЬТРАСТРУКТУРА ТКАНЕЙ <i>EQUISETUM ARVENSE</i> L.	146
Труш В. В., Соболев В. И. ЭФФЕКТЫ ДЛИТЕЛЬНО ВВОДИМОЙ α -ЛИПОЕВОЙ КИСЛОТЫ НА НЕРВНО- МЫШЕЧНЫЙ АППАРАТ В МОДЕЛЬНЫХ ЭКСПЕРИМЕНТАХ НА ЖИВОТНЫХ ..	158
Фролова Г. А., Четверик А. В., Парамонова А. К. МОДИФИКАЦИИ ТРЕВОЖНОГО ПОВЕДЕНИЯ У АЛКОГОЛИЗИРОВАННЫХ САМЦОВ БЕЛЫХ КРЫС С ДИСБАЛАНСОМ АНДРОГЕНОВ ПРИ СТИМУЛЯЦИИ ДОФАМИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ МАДОПАРОМ.....	182
Черетаев И. В., Хусаинов Д. Р., Коренюк И. И., Чуян Е. Н., Раваева М. Ю., Шульгин В. Ф., Гусев А. Н. НЕЙРОТРОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ САЛИЦИЛАТОВ: ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ.....	201
Эйсмонт Е. В., Начарова М. А., Никифорова Е. В. ОПТИМИЗАЦИЯ ПСИХОФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ДЕТЕЙ С ЗАДЕРЖКОЙ ПСИХОРЕЧЕВОГО РАЗВИТИЯ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ОБРАТНОЙ СВЯЗИ ПО ПАРАМЕТРАМ ЭЭГ	214
Юркова И. Н., Омельченко А. В., Панов Д. А. ЗАЩИТНО-СТИМУЛИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ НАНОСЕЛЕНА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СПОСОБА ПРЕДПОСЕВНОЙ ОБРАБОТКИ СЕМЯН ПШЕНИЦЫ В УСЛОВИЯХ КОМБИНИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ ЗАСОЛЕНИЯ И ЗАСУХИ	222
Ярош О. Б. ВИЗУАЛЬНЫЙ НЕЙРОМАРКЕТИНГ: МЕТОДОЛОГИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИНСТРУМЕНТЫ.....	233

ХИМИЧЕСКИЕ НАУКИ

Вяткина О. В., Бажин В. Ю., Александрова Д. Д. АНАЛИЗ ПРОБЛЕМЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ	248
Гришковец В. И., Норкин А. С., Яковишин Л. А., Корж Е. Н. ВЛИЯНИЕ ФОСФАТОВ НАТРИЯ НА ПРОЦЕСС ОТВЕРЖДЕНИЯ ГИПСА.....	262
Трубицын М. А., Хоанг Вьет Хунг, Фурда Л. В. СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНО-МОРФОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КАЛЬЦИЙ-ДЕФИЦИТНОГО КАРБОНАТСОДЕРЖАЩЕГО ГИДРОКСИАПАТИТА В ПРИСУТСТВИИ ЦИТРАТ-ИОНОВ.....	270
Шейх-Заде М. И. О ФОРМЕ КОНТУРА СПЕКТРАЛЬНОЙ ЛИНИИ 1315 нм АТОМАРНОГО ИОДА ...	278
Шемшединова Э. Ш., Морозкина Е. В., Шарох А. А., Бейтуллаев А. М., Кацев А. М. ИЗУЧЕНИЕ ИММОБИЛИЗАЦИИ МОРСКИХ СВЕЯЩИХСЯ БАКТЕРИЙ НА ВЫСОКОДИСПЕРСНОМ КРЕМНЕЗЕМЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТРАДИЦИОННЫХ И ЦИФРОВЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	285
Яковишин Л. А., Бажан П. И., Ратников В. Д., Гришковец В. И. ТРИТЕРПЕНОВЫЕ САПОНИНЫ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОЙ ДОБАВКИ К ПИЩЕ НА ОСНОВЕ ПЛЮЩА.....	296
СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ	305
СОДЕРЖАНИЕ	314