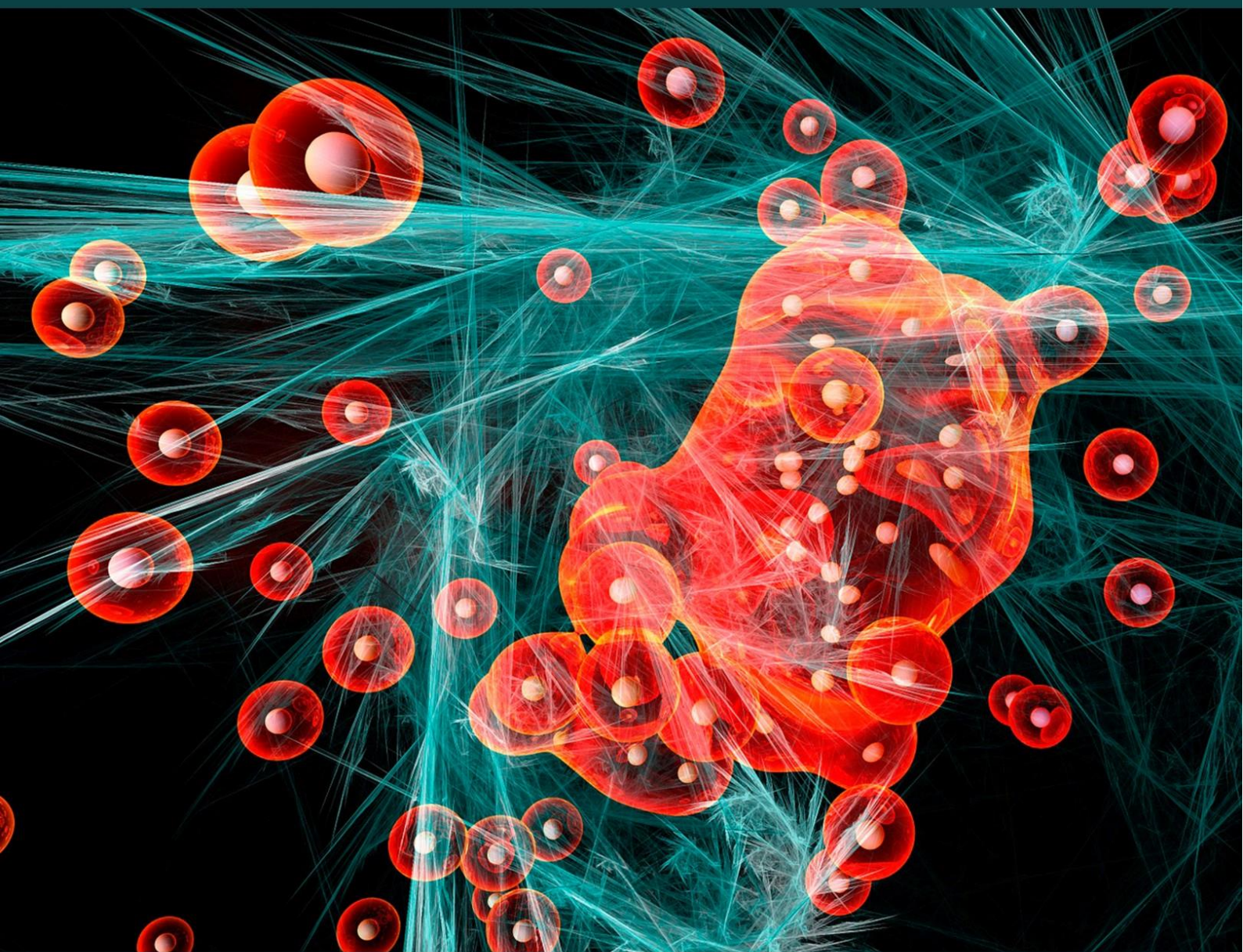


Орбиталь



№ 1, 2017

theorbital.ru

Электронный научный журнал
Орбиталь

№ 1 — сентябрь 2017 г.

Все статьи, публикуемые в журнале, рецензируются членами редакционного совета, а также привлеченными редакцией экспертами.

Журнал ориентирован на широкий круг ученых, специалистов-практиков, студентов, магистрантов и преподавателей, участвующих в научно-исследовательской работе.

Мнение авторов может не совпадать с мнением редакции.

Издатель: ООО «Межрегиональный институт развития территорий», Ялта, Республика Крым. Главный редактор журнала — Макаричева Анна Алексеевна — кандидат биологических наук, доцент кафедры валеологии и безопасности жизнедеятельности Таврической академии Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского.

Учредители: ООО «Межрегиональный институт развития территорий», О. В. Старцева.

Журнал издается с сентября 2017 года.

Издание зарегистрировано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор). Свидетельство о регистрации: ЭЛ № ФС 77-70590 от 03.08.2017 (СМИ — «сетевое издание»).

Периодичность: 4 раза в год.

Выпуски журнала размещаются на сайте www.theorbital.ru
E-mail редакции: red@theorbital.ru

Редакционный совет

Макаричева Анна Алексеевна — главный редактор, канд. биол. наук, доцент кафедры валеологии и безопасности жизнедеятельности Таврической академии Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского

Старцева Ольга Валентиновна — директор журнала, ответственный секретарь

Члены редакционного совета:

Евстафьева Елена Владимировна — д-р мед. наук, д-р биол. наук, профессор, заведующий кафедрой нормальной физиологии и отделом экологических рисков Медицинской академии им. С. И. Георгиевского Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского, заслуженный деятель науки и техники Республики Крым

Микулец Юрий Иванович — д-р биол. наук, проректор по научной работе в Автономной некоммерческой организации высшего образования «Московский гуманитарно-экономический университет»

Нехорошев Сергей Викторович — д-р техн. наук, ведущий научный сотрудник проблемной научно-исследовательской лаборатории Ханты-Мансийской государственной медицинской академии

Родин Игорь Александрович — д-р хим. наук, заместитель декана химического факультета по инновационной деятельности, старший научный сотрудник Аналитического центра химического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова

Федотова Юлия Олеговна — д-р биол. наук, профессор кафедры химии и молекулярной биологии Университета информационных технологий, механики и оптики, ведущий научный сотрудник лаборатории нейроэндокринологии Института физиологии имени И. П. Павлова Российской академии наук

Абляимов Осман Куртсеитович — PhD in chemistry, ведущий научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории Медицинской академии им. С. И. Георгиевского Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского

Айрапетов Марат Игоревич — канд. мед. наук, старший научный сотрудник отдела нейрофармакологии им. С. В. Аничкова, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины»

Белов Денис Владимирович — канд. хим. наук, доцент кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии Нижегородской государственной медицинской академии

Василевич Наталья Ивановна — канд. хим. наук, руководитель направления медицинской химии компании АСИНЭКС

Веремеева Полина Николаевна — канд. хим. наук, младший научный сотрудник кафедры медицинской химии и тонкого органического синтеза химического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова

Власова Юлия Александровна — канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории СЗГМУ имени И. И. Мечникова

Груздев Матвей Сергеевич — канд. хим. наук, старший научный сотрудник лаборатории «Структура и динамика молекулярных и ион-молекулярных растворов» Института химии растворов имени Г. А. Крестова Российской академии наук

Дремук Ирина Александровна — канд. биол. наук, научный сотрудник ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»

Еремеев Артём Валерьевич — канд. биол. наук, заместитель генерального директора по производству, Общество с ограниченной ответственностью «Селлтера Фарм», Владимирская область

Корнилов Кирилл Николаевич — канд. хим. наук, заместитель директора по научно-методической работе в частной школе «Данко»

Назаров Павел Александрович — канд. биол. наук, старший научный сотрудник отдела биоэнергетики Научно-исследовательского института физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского, МГУ имени М. В. Ломоносова

Никенина Екатерина Валерьевна — канд. биол. наук, младший научный сотрудник ФГБУ НИИ нормальной физиологии имени П. К. Анохина, ассистент кафедры нормальной физиологии Первого МГМУ имени И. М. Сеченова

Рогожкина Елена Алексеевна — канд. хим. наук, начальник аналитического отдела Центра Разработки и Регистрации Лекарственных средств ООО «ИРВИН 2»

Свистунова Наталья Юрьевна — канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник отдела агробиологии и селекции ФГБНУ Всероссийского научно-исследовательского института лекарственных и ароматических растений (ФГБНУ ВИЛАР)

Серегин Михаил Васильевич — канд. с.-х. наук, доцент кафедры растениеводства Пермской государственной сельскохозяйственной академии имени Д. Н. Прянишникова

Симагина Наталья Олеговна — канд. биол. наук, доцент, начальник учебно-методического управления Департамента образовательной деятельности Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского

Смирнова Ксения Валерьевна — канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории вирусного канцерогенеза НИИ канцерогенеза РОНЦ имени Н. Н. Блохина Минздрава РФ

Фонин Александр Владимирович — канд. биол. наук, старший научный сотрудник Института цитологии Российской академии наук

Члены редакционного совета, эксперты академического английского:

Anthony Nwohiri, PhD in Computer Science and Information Technology, Senior lecturer, Department of Information Management Technology, Federal University of Technology, Owerri, Nigeria (Native speaker)

Gulnara Musuralieva, PhD in Biology, Lecturer, Department of Physics, Mathematics, Informatics and Computer Technologies, Kyrgyz State Medical Academy named after I.K. Akhunbaev; Translator, GMC Translation Agency, Bishkek, the Kyrgyz Republic; Translator, TLS Translation Agency, Moscow, the Russian Federation.

Matvey Gruzdev, PhD in Chemistry, Principal scientist, Laboratory «Structure and dynamics of molecular and ion-molecular solutions», G.A. Krestov Institute of Solution Chemistry, RAS

Natalya I. Vasilevich, PhD in Chemistry, Head of Medicinal Chemistry, ASINEX Ltd.

Osman Abliyalimov, PhD in Chemistry, Principal Scientist, Central Research Laboratory Medical Academy named after S.I. Georgievsky of Crimean Federal University named after V.I. Vernadsky

Valentina Marija Romantchikova, Academic English Translator (Native speaker)

Содержание

Предисловие к выпуску №1 6

ХИМИЧЕСКИЕ НАУКИ

О. В. Старцева, И. Н. Палий, Н. О. Симагина, А. А. Макаричева
Быстрый метод полуколичественного определения хлорогеновой
кислоты и её производных в полыни 7

А. К. Гаспарян, С. В. Нехорошев, В. П. Нехорошев, А. С. Князев, Д. А. Какова
Синтез пиромеллитовых индикаторов на основе пиромеллитового диангидрида 15

БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

О. А. Гребенникова, А. Е. Палий, Л. А. Хлыпенко, В. Д. Работягов
Биологически активные вещества *Hyssopus officinalis* L. 21

М. И. Айрапетов, С. О. Ереско
Динамика изменений количества мРНК рецептора кортиколиберина второго типа
в гиппокампе у хронически алкоголизированных крыс в условиях абстиненции 29

Ю. О. Федотова
Влияние агониста и антагониста D₂-типа дофаминовых рецепторов на обучение
при разном уровне андрогенов у крыс 38

СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ НАУКИ

М. В. Серёгин
Влияние вида субстрата и времени его подготовки на степень размножения
мицелия вёшенки обыкновенной (*Pleurotus ostreatus*) 49

Content

Foreword to the issue №1 **6**

CHEMISTRY

Startseva O., Paliy I., Simagina N., Makaricheva A.

Fast semi-quantitative method of determination of chlorogenic acid and its derivatives in sagebrush **7**

Gasparyan A.K., Nekhoroshev S.V., Nekhoroshev V.P., Knyazev A.S., Kakova D.A.

Synthesis of pyromellitein indicators based on pyromellitic dianhydride **15**

BIOLOGY

Grebennikova O.A., Paliy A.Y., Khlypenko L.A., Rabotyagov V.D.

Biologically active substances of *Hyssopus officinalis* L. **21**

Airapetov M.I., Eresko S.O.

Dynamics of variation of mRNA amount of CRF-R2 receptor in hippocampus of chronically alcoholized rats under alcohol withdrawal **29**

Fedotova Y.O.

Influence of agonist and antagonist for D₂-type dopaminergic receptors on avoidance performance in rats with different androgens levels **38**

AGRICULTURAL SCIENCE

Seregin M.V.

Influence of type of substrate and duration of its preparation on rate of reproduction of *Pleurotus ostreatus* mycelium **49**

Предисловие к выпуску №1

Перед вами первый выпуск рецензируемого научного журнала «Орбиталь». В журнале публикуются научные обзоры, статьи проблемного и прикладного характера, соответствующие следующим научным направлениям: химические, биологические, сельскохозяйственные и фармацевтические науки.

Журнал «Орбиталь» создан нами используя концепцию открытого доступа (Open Access) с целью распространения научной информации в сфере естественных наук. Важной миссией журнала является предоставление авторам возможности публиковаться в источниках с большей доступностью для читателей, а читателям — иметь полноценный свободный доступ к научному контенту.

Мы постарались создать эффективный механизм оценки качества публикуемых материалов. Журнал практикует оценку статей по системе двойного слепого рецензирования не менее чем двумя-тремя рецензентами. К рецензированию привлекаются члены редакционного совета, признанные специалисты в отдельных отраслях естественных наук, а также ученые, имеющие научный авторитет и работающие в области знаний, к которой относится содержание рукописи, имеющие в течение последних трех лет публикации по тематике рецензируемой статьи. Качественные рефераты на английском языке, одобренные нашими экспертами академического английского, позволят иностранным читателям получить представление об опубликованных статьях.

Важной частью работы журнала является развитие естественнонаучного направления в Крыму. В сфере научных интересов сотрудников журнала возможно сотрудничество, запуск совместных стартапов. Бесплатно публикуются статьи по направлениям исследований, осуществляемым учредителем издания, а также совместные проекты с членами редакционного совета журнала.

Проделанная работа позволяет нам надеяться на длительное плодотворное сотрудничество с авторами научных публикаций в сфере естественных наук. Вместе с тем, многое еще предстоит сделать, и редакционная коллегия готова осуществлять мероприятия, необходимые для дальнейшего развития журнала.

Глава редакционного совета

Анна Макаричева

ХИМИЧЕСКИЕ НАУКИ / CHEMISTRY

УДК: 543.544

**БЫСТРЫЙ МЕТОД ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ХЛОРОГЕНОВОЙ КИСЛОТЫ И ЕЁ ПРОИЗВОДНЫХ В ПОЛЫНИ**

О. В. Старцева^{а,б}, И. Н. Палий^а, Н. О. Симагина^б, А. А. Макаричева^б

*а — Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад
— Национальный научный центр» Российской академии наук
Республика Крым, г. Ялта, пгт. Никита*

*б — Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования «Крымский федеральный университет
имени В. И. Вернадского, Таврическая академия
Республика Крым, г. Симферополь*

Разработана методика быстрого полуколичественного определения хлорогеновой кислоты и ее производных в полыни. Проанализированы два вида полыни, произрастающей в дикой природе Крыма. Показана эффективность данной методики для оценки содержания этих биологически активных соединений с целью их последующего выделения из растительного сырья.

Ключевые слова: хроматография, фенольные соединения, хлорогеновая кислота, дикофеилхинные кислоты, растительное сырье.

Введение

Хлорогеновая кислота и её производные обладают выраженной биологической активностью, в частности, проявляют противогепатитную активность, ингибируют активность ряда ферментов, являются сильными антиоксидантами [1, 2]. Поэтому разработка методик определения этих веществ является актуальной задачей.

Хроматографические методы широко используются для анализа биологически активных веществ (далее БАВ), в том числе содержащихся в растительном сырье [3, 4]. Для изучения состава БАВ на разных стадиях онтогенеза растений удобны методики анализа, не требующие больших затрат времени. В современной фармакопейной статье «Полыни горькой трава ФС.2.5.0033.15» приведено только качественное определение хлорогеновой кислоты. Целью данной работы является разработка мобильного метода полуколичественного определения хлорогеновой кислоты и её производных в полыни, который можно было бы использовать для изучения принципиальных различий состава растения на разных стадиях онтогенеза, сравнения разных видов полыни по содержанию БАВ, а также выбора подходящих условий для полупрепаративного выделения кофеилхинных кислот.

Исследования проводили на примере дикорастущих полыней Крыма *Artemisia santonica* L. и *Artemisia taurica* Willd. Полынь сантонийская (*Artemisia santonica* L.) является характерным компонентом галофильно-луговостепной растительности на солонцеватых и солончаковатых почвах в долинах рек, по окраинам озер, лиманов, приморских лугов юга Восточной Европы [5]. Полынь таврическая *Artemisia taurica* Willd произрастает на

территории Ростовской и Волгоградской областей, Таманского полуострова, Северного Кавказа, прикаспийских степях, а также широко распространена в степной части Крыма.

Оборудование и материалы

Для работы использовали ацетонитрил чистоты для ВЭЖХ (Pancreas), муравьиную кислоту чистоты для ВЭЖХ (Merk), стандартные образцы хлорогеновой и 1,5-ди-О-кофеилхиновой кислот (Sigma-Aldrich). Деионизированную воду получали с помощью системы очистки воды MilliQ (Millipore).

Для подготовки проб применяли ультразвуковую баню SW 12 Н, использовали фильтры-насадки на шприц Syringe Filter 25 мм 0,45 мкм PTFE (Restek).

Разделение фенольных веществ проводили на хроматографе Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific), укомплектованном поддоном для растворителей, четырёхканальным насосом с дегазатором, автосамплером, термостатом колонок и диодноматричным детектором. Для проведения анализа использовали аналитические хроматографические колонки Eclipse Plus C18 (4,6 мм, 250 мм, 5 мкм, Agilent Technologies) и Poroshell 120, EC-C18 (2,1 мм, 100 мм, 2,7 мкм, Agilent Technologies).

Статистические данные обрабатывали при помощи лицензированного программного обеспечения СПЛАЙН.

Результаты и обсуждение

В ходе изучения состава фенольных веществ полыни нами было обнаружено наличие в её надземной части хлорогеновой кислоты и ее производных. Аналитические измерения проводили по методике, детально изложенной в работе [6]. В процессе изучения ряда особенностей состава растения, например, поиска принципиальных различий растения-донора с растением-акцептором, оказывающих влияние друг на друга, требуется работа со свежесобраным растительным материалом. Транспортировка растений от разных площадок сбора времязатратна. Поэтому мы изучали стабильность проб растений при хранении в холодильнике. При исследовании нелетучих фенольных соединений полыни оказалось, что хранение при +4°C приводит как к увеличению содержания этих веществ в пробе, так и к изменению соотношения основных компонентов пробы.

На рисунке 1 представлена хроматограмма надземной части свежесобранной полыни *Artemisia santonica* L.. На рисунке 2 — хроматограмма этого же растения после недельного хранения в холодильнике при +4°C.

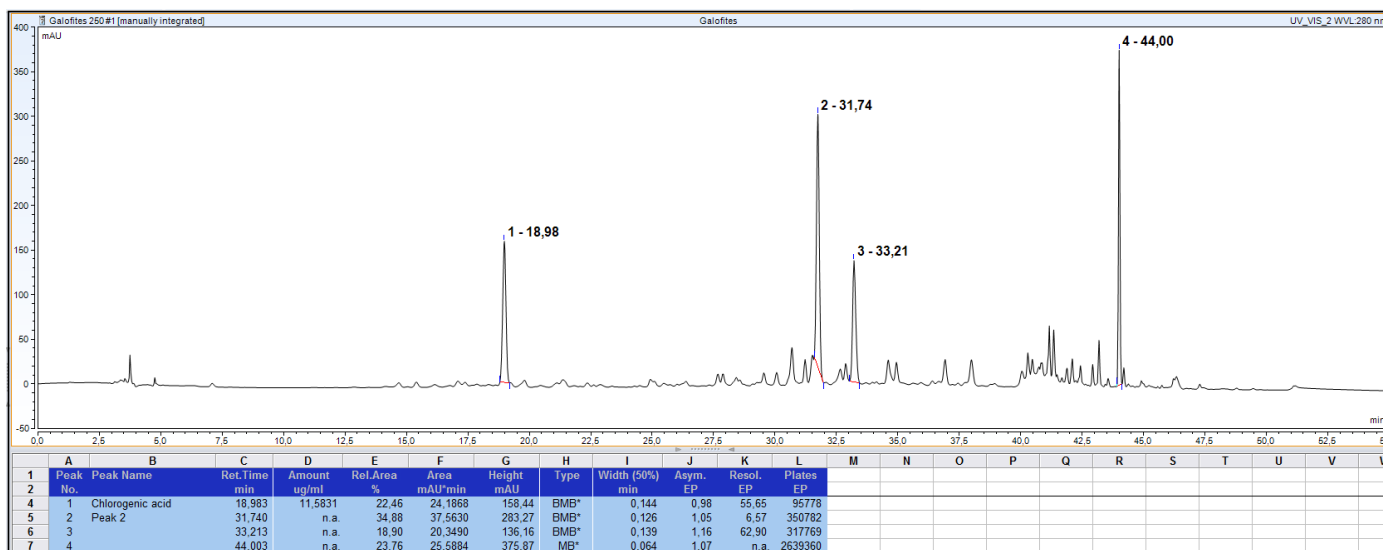


Рис. 1. — Хроматограмма надземной части свежесобранной полыни *Artemisia santonica* L. (280 нм).

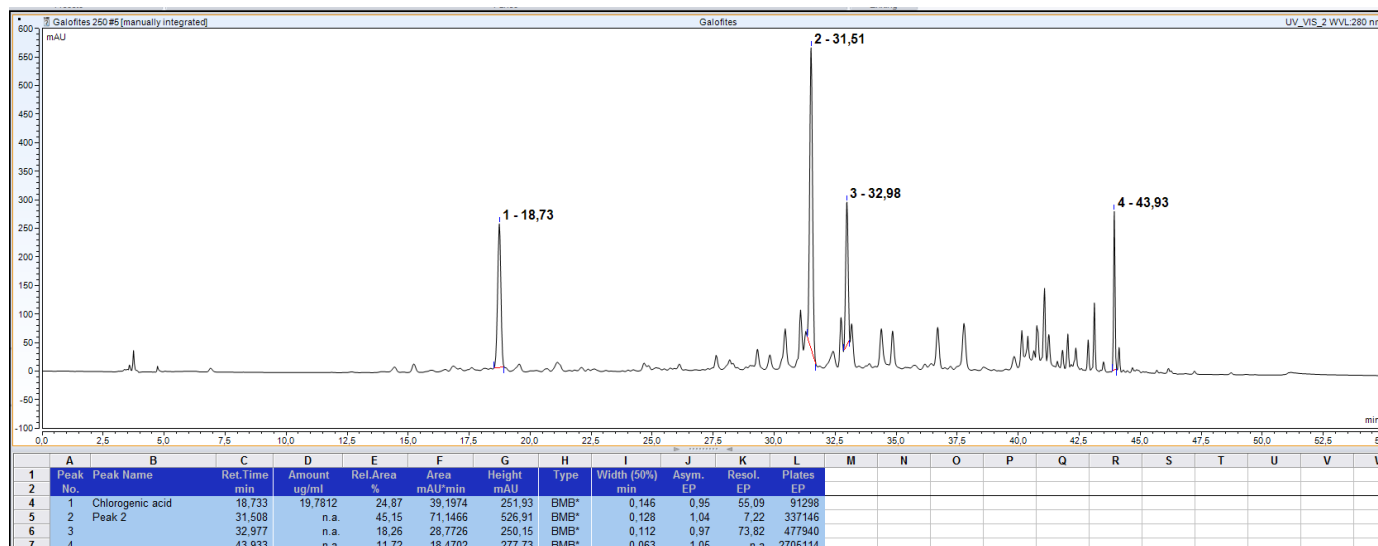


Рис. 2. — Хроматограмма надземной части полыни *Artemisia santonica* L. после хранения растения в течение 10 дней (280 нм).

В таблице 1 приведены данные количественного определения содержания хлорогеновой кислоты в растении, а также соотношение площадей пиков хлорогеновой кислоты и второго основного компонента пробы (исходя из площади хроматографического пика). В свежесобранном растении отношение площадей пиков 2 и 1 составляет 1,55 (рисунок 1), тогда как после хранения при охлаждении 1,82 (рисунок 2). Содержание этих двух веществ также меняется в сторону увеличения. Ультрафиолетовый спектр вещества 2 имеет фактор подобия спектров со стандартом 1,5-ди-О-кофеилхинной кислоты равный 99,1, но отличается по времени удерживания (рисунки 3–5).

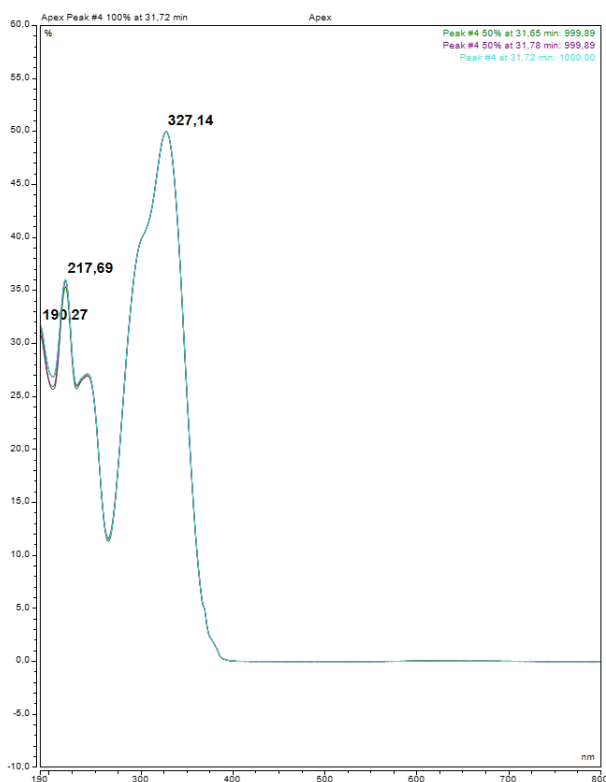


Рис. 3. — Спектр вещества 2 в диапазоне 190–800 нм.

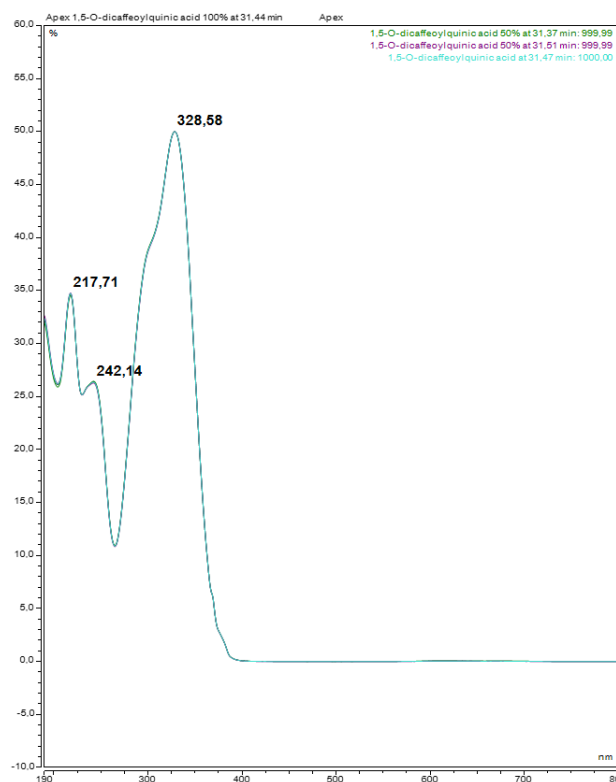


Рис. 4. — Спектр 1,5-ди-О-кофеилхинной кислоты в диапазоне 190–800 нм.

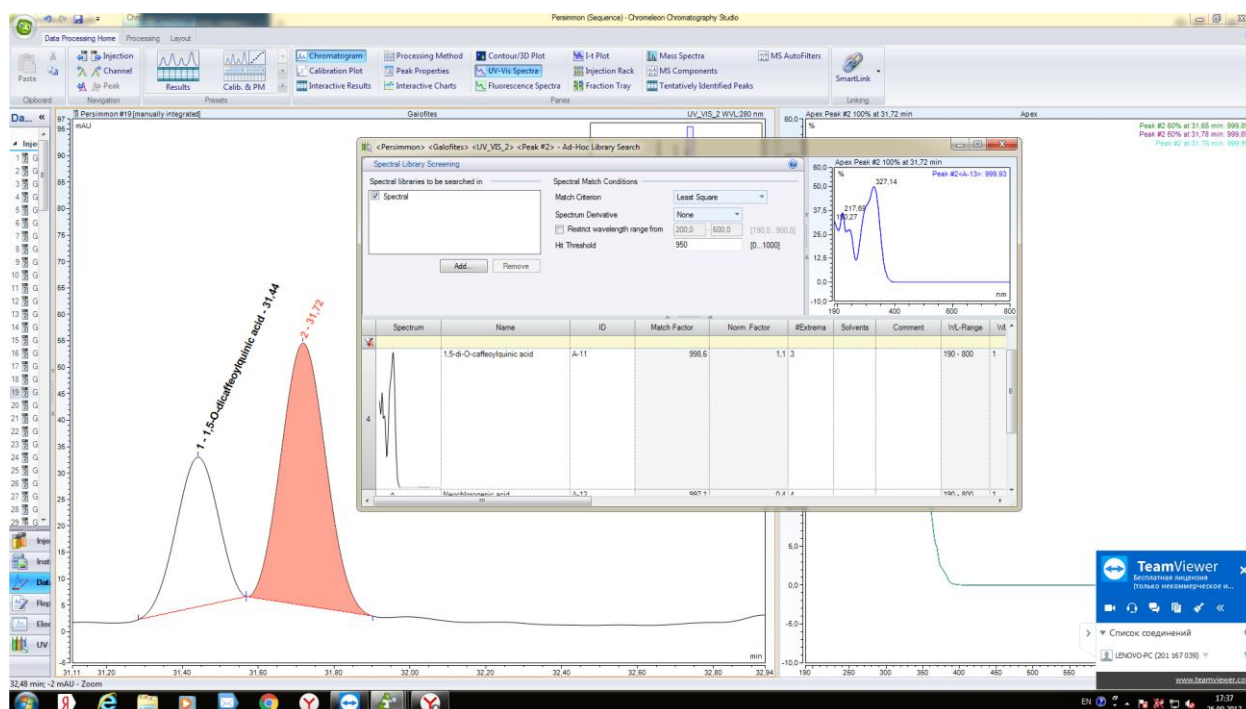


Рис. 5. — Разрешение пиков 1,5-ди-О-кофеилхинной кислоты и вещества 2 и подобие их спектров для сигналов сравнимой интенсивности.

Это позволяет предположить, что данное вещество является также ди-О-кофеилхинной кислотой, но другим изомером (по результатам эксперимента и литературным данным [7]). Полученные данные показывают нестабильность проб при хранении, наблюдается тенденция к изменению соотношения основных компонентов, а также изменения их концентрации в сторону увеличения.

Таким образом, нужно проводить пробоподготовку и анализ растения в день сбора, так как за время хранения данные по содержанию изучаемых веществ могут быть искажены. Следовательно, необходим мобильный метод анализа и быстрая пробоподготовка, что позволит выполнять большее число анализов в день, а значит и сравнивать больше растений.

Таблица 1

Содержание хлорогеновой кислоты в надземной части *Artemisia santonica* L.

№	Образец растительного сырья	Содержание хлорогеновой кислоты, мг/100 г	Отношение площади пика с временем удерживания 31,5 мин к площади пика хлорогеновой кислоты
1	<i>Artemisia santonica</i> L. (свежесобранная)	21,1±0,4	1,55
2	<i>Artemisia santonica</i> L. (хранение 10 дней)	33,6±0,5	1,82

На разных стадиях онтогенеза в растении происходит существенное изменение концентрации основных компонентов. Для оценки содержания биологически активных веществ с целью оценки возможности их препаративного выделения, а также выбора сезона для сбора сырья удобны методы полуколичественного определения, не требующие значительных затрат времени. С целью создания такого метода нами была выбрана

аналитическая колонка Poroshell 120, EC-C18 (2,1 мм, 100 мм, 2,7 мкм, Agilent Technologies). Отбирали пробу надземной части растения массой 5 г, измельчали ножницами до размера частиц 3–5 мм, перемешивали и отбирали образцы для анализа массой 500 мг. Такой образец перетирали в ступке с битым стеклом до измельчения в муку. Экстрагировали двумя порциями смеси вода — ацетонитрил (50/50 по объему), выдерживая в ультразвуке по 7 минут. Объединенный экстракт фильтровали через фильтр — насадку на шприц с диаметром пор 0,45 мкм.

Градиентное элюирование осуществляли по схеме, приведенной в таблице 2.

Таблица 2

Профиль градиента подвижной фазы для колонки Poroshell C18

Подвижная фаза	Время анализа, мин						
	0	1	6	9	10	10,5	12
А- ацетонитрил, %	5	5	30	90	100	100	95
В- раствор муравьиной кислоты (0,1 об. %) в деионизированной воде, %	95	95	70	10	0	0	95

Скорость потока элюента составила 1,3 мл/мин, объём дозируемой пробы 10 мкл, температура термостата колонок — 40 °С. Детектирование проводили на длинах волн 280 и 325 нм, так как длина волны 280 нм часто используется для изучения профиля всех нелетучих фенольных соединений, а 325 нм — это наиболее близкое значение к максимуму поглощения кофеилхиновых кислот. Время аналитического измерения в данных условиях удалось сократить до 12 минут, для уравнивания системы перед следующим анализом дополнительно насыщали колонку стартовой системой в течение 2 минут. Суммарные затраты времени с учётом подготовки пробы составили 33 минуты.

На рисунке 6 представлена хроматограмма надземной части *Artemisia taurica Willd.*, проанализированной в данных условиях.

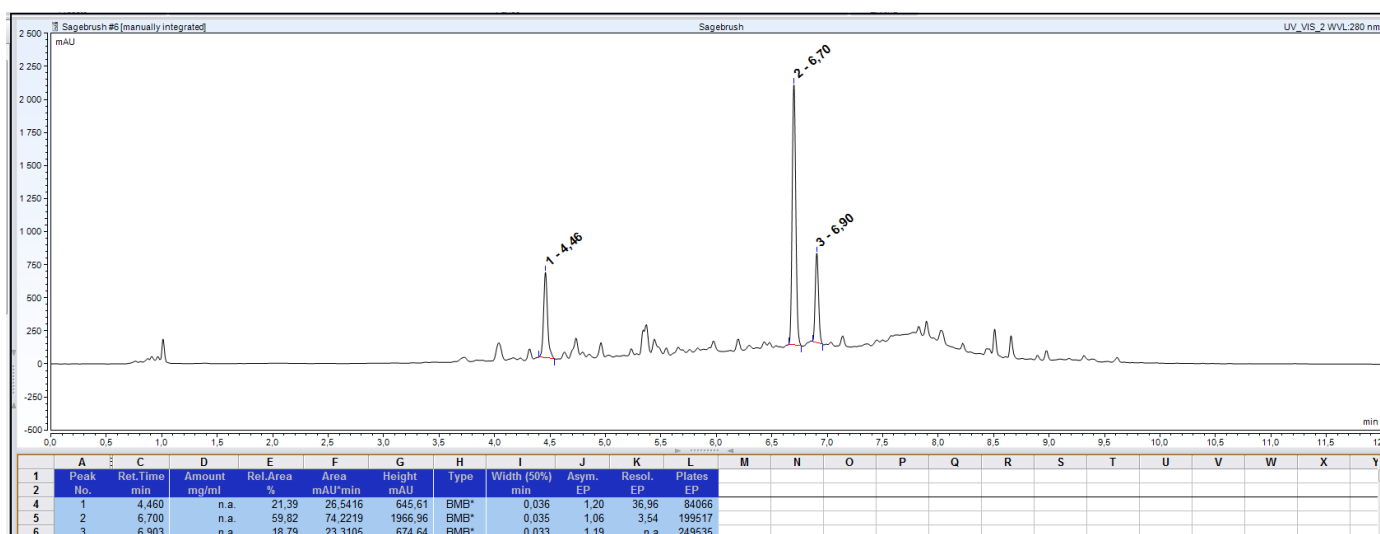


Рис. 6. — Хроматограмма надземной части полыни *Artemisia taurica Willd.* после хранения растения в течение 14 дней (280 нм).

Несмотря на сокращение времени эксперимента, удалось сохранить достаточное разрешение пиков основных компонентов пробы — 1, 2 и 3. Вещество 1 — хлорогеновая кислота, вещество 2 — не идентифицировано, вещество 3 соответствует веществу 2 с временем удерживая 31,5 мин в предыдущем эксперименте (фактор подобия спектров 99,98).

Для дополнительного сокращения времени анализа мы исследовали возможность оценки содержания хлорогеновой кислоты и дикофеилхинных кислот, используя простую пропорцию по данным площадей пиков вещества в пробе и стандартного образца, площадь пика которого находилась в диапазоне 50–200 % от площади пика исследуемого вещества в пробе. Результаты эксперимента приведены в таблице 3.

Таблица 3

Относительная погрешность аналитического измерения содержания кофеилхинных кислот в пробах наземной части *Artemisia taurica* Willd. в разных условиях

№	Условия	Хлорогеновая кислота	1,5-ди-О-кофеилхинная кислота
1	Количественное определение компонента по пяти калибровочным точкам	1,5%	1,6%
2	Полуколичественное определение методом простой пропорции, площадь пика стандартного образца 50–100% от площади пика вещества в пробе	4 %	5%
3	Полуколичественное определение методом простой пропорции, площадь пика стандартного образца 120–200% от площади пика вещества в пробе	>50%	>50%

Согласно полученным данным приемлемым условием для полуколичественного анализа является использование калибровочного стандарта, площадь пика которого находится в диапазоне 50–100 % от площади пика исследуемого вещества в пробе. Нами также изучена степень извлечения хлорогеновой и 1,5 — ди-О-кофеилхинной кислоты из сырья. Вносили добавку хлорогеновой и 1,5-ди-О-кофеилхинной кислоты (100 мкл раствора концентрацией 250 мкг/мл) в пробу полыни и определяли отношение внесено — найдено в условиях количественного анализа. Степень извлечения хлорогеновой кислоты составила 91%, дикофеилхинной — 83%. Предел обнаружения метода рассчитывали при помощи программного обеспечения СПЛАЙН.

Таблица 4

Некоторые метрологические характеристики методики

№	Параметр	Хлорогеновая кислота	1,5-ди-О-кофеилхинная кислота
1	Внесено/найденно, мкг в пробе	50,0/45,5	25,0/20,8
2	Предел обнаружения методики при детектировании на 280 нм, мг в 100 г сырой массы	1,0	1,5
3	Предел обнаружения методики при детектировании на 325 нм, мг в 100 г сырой массы	0,48	0,83

Таким образом, данная методика может быть использована для полуколичественной оценки содержания хлорогеновой кислоты и ее производных в полыни, например, для

мониторинга состава БАВ в растении на разных стадиях онтогенеза и определения наиболее благоприятного времени для сбора этого растительного сырья.

Выводы

В результате исследования нелетучих фенольных соединений полыни установлена нестабильность проб растения при хранении в холодильнике при +4°C. Показано, что содержание фенольных веществ увеличивается в процессе такого хранения, что по-видимому, связано с протеканием ферментативных процессов. Разработана методика быстрого полуколичественного определения гидроксикоричных кислот как основных компонентов в надземной части полыни. Данная методика удобна для мониторинга содержания хлорогеновой кислоты и её производных в полыни на разных стадиях онтогенеза растения, а также для контроля содержания этих веществ с целью последующего препаративного выделения.

Благодарность

Авторы выражают благодарность компании ООО «Спектроника» за своевременную техническую и методическую поддержку.

Литература

1. McDougall B. Dicafeoylquinic and Dicafeoyltartaric acids are selective inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 integrase // B. McDougal, P.J. King, B. Wen Wu, Z. Hostomsky [et al.] // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 1998 – V. 42, №1 – P. 140–146.
2. Yong Zhao. UFLC/MS-IT-TOF guided isolation of anti-HBV active chlorogenic acid analogues from *Artemisia capillaris* as a traditional Chinese herb for the treatment of hepatitis / Zhao Yong, Chang-An Geng, Yun-Bao Ma, Xiao-Yan Huang [et al.] // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2014 – V. 156. – P. 147-154.
3. Яшин Я. И. Газовая хроматография / Я. И. Яшин, Е. Я. Яшин, А. Я. Яшин. – Москва: ТрансЛит, 2009. – 528 с.
4. Сычев К. С. Практический курс жидкостной хроматографии / К. С. Сычев. – М: КОКОРО. – 2013. – 261 с.
5. Лавренко Е. М. Степи / Е. М. Лавренко, Г. И. Билык // *Растительность европейской части СССР* / С. А.Грибова, Т. И. Исаченко, Е. М.Лавренко. – Ленинград : Наука, 1980. – С. 203-272.
6. Старцева О. В. Фенольные соединения плодов хурмы сортов коллекции Никитского ботанического сада / О. В. Старцева, И. Н. Палий, С. Ю. Хохлов, В. А. Мельников // *Таврический научный обозреватель*. – 2017. – № 4 (21), ч.1. – С. 179-183.
7. Zhang Lu. Solvent optimization, antioxidant activity, and chemical characterization of extracts from *Artemisia selengensis* Turcz / Zong-cai Tu, Tao Yuan, Hui Wang, Zhi-feng Fu [et al.] // *Industrial Crops and Products*. – 2014 – V. 56 – P. 223-230.

FAST SEMI-QUANTITATIVE METHOD OF DETERMINATION OF CHLOROGENIC ACID AND ITS DERIVATIVES IN SAGEBRUSH

Startseva O.^{a,b}, Paliy I.^a, Simagina N.^b, Makaricheva A.^b

a — *Federal State Budgetary Institution of Science "Order of the Red Banner of Labor Nikitsky Botanical Garden — National Science Center" of the Russian Academy of Sciences Russia, Republic of Crimea, Yalta, Nikita.*

b — *Tavrida Academy of the V.I. Vernadsky Crimean Federal University*

Abstract. Fast semi-quantitative method of determination of chlorogenic acid and its derivatives in sagebrush has been developed. Two wild-growing Crimean sagebrush species have been analyzed. The efficiency of this method to estimate the content of these biologically active compounds aiming to their further separation from herbal raw material has been shown.

Keywords: chromatography, phenolics, chlorogenic acid, di-O-caffeoylquinic acids, herbal raw material.

References

1. McDougall B. Dicafeoylquinic and dicafeoyltartaric acids are selective inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 integrase // B. McDougal, P.J. King, B. Wen Wu, Z. Hostomsky, M G. Reinecke, W. Edward Robinson Jr // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1998, V. 42, №1, pp. 140–146.
2. Yong Zhao. UFLC/MS-IT-TOF guided isolation of anti-HBV active chlorogenic acid analogues from *Artemisia capillaris* as a traditional Chinese herb for the treatment of hepatitis / Zhao Yong, Chang-An Geng, Yun-Bao Ma, Xiao-Yan Huang [et al.] // *Journal of Ethnopharmacology*, 2014, V. 156, pp. 147-154.
3. Jashin Ja.I. Gazovaja hromatografija / Ja.I. Jashin, E. Ja. Jashin, A. Ja. Jashin. Moskva: TransLit, 2009, 528 p.
4. Sychev K.S. Prakticheskij kurs zhidkostnoj hromatografii / K.S. Sychev // M: KOKORO, 2013, 261 p.
5. Lavrenko E.M. Stepi / E. M. Lavrenko, G. I. Bilyk // *Rastitel'nost' evropejskoj chasti SSSR / S. A.Gribova, T. I. Isachenko, E. M.Lavrenko–Leningrad : Nauka*, 1980, pp. 203-272.
6. Starceva O. V. Fenol'nye soedinenija plodov hurmy sortov kollekcii Nikitskogo botanicheskogo sada // O. V. Starceva, I. N.Palij, S. Ju Hohlov., V. A. Mel'nikov // *Tavriceskij nauchnyj obozrevatel'*, 2017, № 4 (21), part 1, pp. 179-183.
7. Zhang Lu. Solvent optimization, antioxidant activity, and chemical characterization of extracts from *Artemisia selengensis* Turcz / Zong-cai Tu, Tao Yuan, Hui Wang, Zhi-feng Fu, Qing-hui Wen, Xiao-qin Wang // *Industrial Crops and Products*, 2014, V. 56 , pp. 223-230.

УДК: 667.283.72

СИНТЕЗ ПИРОМЕЛЛИТОВЫХ ИНДИКАТОРОВ НА ОСНОВЕ ПИРОМЕЛЛИТОВОГО ДИАНГИДРИДА

А. К. Гаспарян^а, С. В. Нехорошев^б, В. П. Нехорошев^а, А. С. Князев^в, Д. А. Какова^в

^а Сургутский государственный университет

^б Ханты-Мансийская государственная медицинская академия

^в Томский государственный исследовательский университет

Проведены поисковые исследования по синтезу пиромеллитовых индикаторов с использованием реакции конденсации ПМДА с фенолами различного строения. Подобраны оптимальные условия синтеза, с использованием в качестве катализатора безводного $ZnCl_2$ при температурах реакции от 120 до 210°C и временем контакта от 3 до 6 часов. Выход пиромеллитовых индикаторов составляет 20-80%, целевые продукты необходимо очищать от примесей. Методами УФ- и ИК-спектроскопии, ВЭЖХ/МС и ДСК установлено строение 7 пиромеллитовых индикаторов.

Ключевые слова: синтез, пиромеллитовые индикаторы, реакции конденсации, основные направления распада, оптимальные условия синтеза, ИК-спектрометрия, дифференциальная сканирующая калориметрия.

Введение

Целью настоящей работы является получение пиромеллитовых индикаторов, путем конденсации пиромеллитового диангидрида с различными фенольными заместителями. Введение двух дополнительных фенольных заместителей в молекулу пиромеллитина должно увеличить интенсивность окраски индикатора в 2 раза по сравнению с фталеинами аналогичного строения [1].

Для синтеза фталеинов используют различные методики с применением серной кислоты, хлорида кадмия, хлорида ртути и хлорида цинка в качестве катализаторов и нитробензола, диметилсульфоксида, толуола, пиридина, хлорбензола, ацетонитрила и N-метилимидазола в качестве растворителей.

При синтезе пиромеллитинов мы использовали в качестве катализатора $ZnCl_2$ в отсутствие растворителей.

В работе использовали пиромеллитовый диангидрид (ПМДА) «99%», фенол «ч.д.а.», о-крезол «99%», резорцин «99%», α -нафтол «ч.д.а.», тимол «ч.», флороглюцин «ч.», гидроксид калия «ч.д.а.», концентрированную соляную кислоту «х.ч.», в качестве катализатора использовали $ZnCl_2$ «ч.».

Катализатор на основе безводного $ZnCl_2$ был приготовлен следующим образом: в металлической ложке расплавляют $ZnCl_2$ над пламенем спиртовой горелки и выдерживают до прекращения выделения пузырей ($\approx 2-4$ мин), затем расплав охлаждают и измельчают в ступке [2].

Основная часть

Основной задачей было разработать методику синтеза новых химических маркеров путем конденсации фенолов различного строения с пиромеллитовым диангидридом (рис. 1 и 2). Синтезы с ПМДА проводят в расплаве фенолов в течении 3–6 часов с $ZnCl_2$ в качестве катализатора, при температурах 120-210°C на немецкой установке фирмы «Hidolph», оборудованной электроплиткой с платиновой термопарой, автоматической мешалкой и обратным холодильником с хлоркальциевой трубкой.

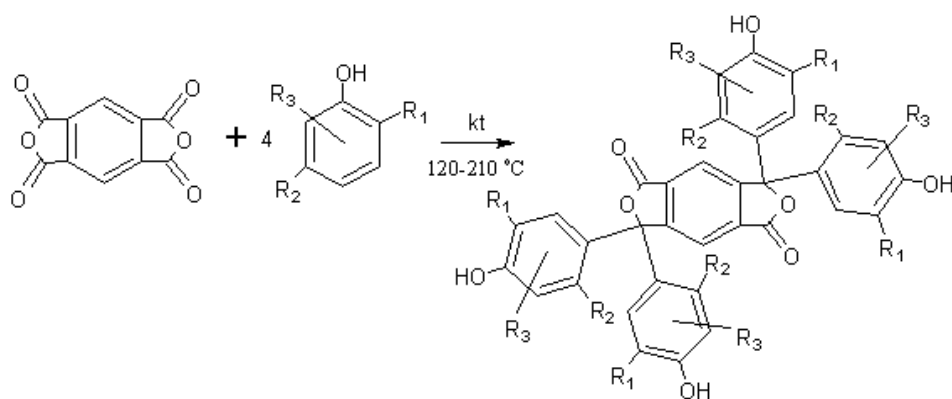


Рис. 1. — Общая схема реакции пиромеллитовых индикаторов.

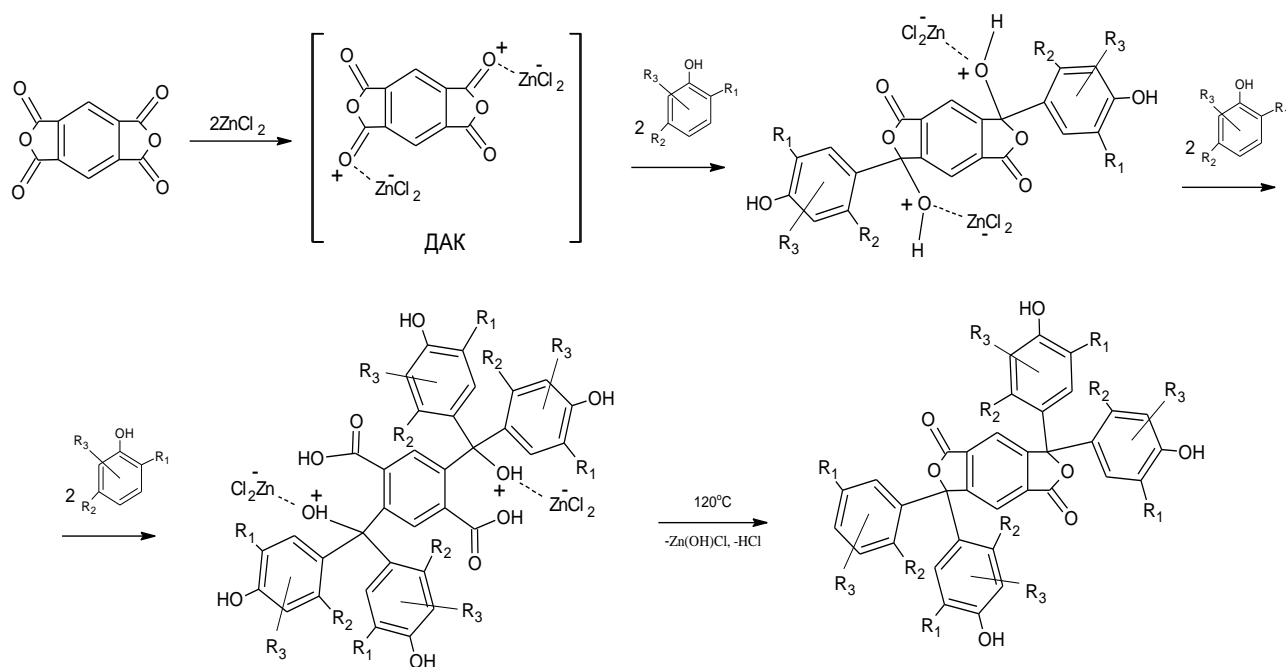


Рис. 2. — Механизм реакции пиромеллитовых индикаторов.

Полученные вещества анализируют методами ТСХ, УФ- и ИК-спектроскопией, ДСК и ВЖХ/МС, определяют интервал перехода индикатора.

При анализе смеси методом ТСХ навеску, синтезированных кристаллических и смолообразных веществ, около 0,5–1 мг растворяют в 0,5–1 мл водно-спиртовых растворах (70% — этилового спирта и 30% — дистиллированной воды), затем наносят примерно 0,5 мкл раствора образцов на стартовую линию хроматографических пластин марки «Sorbfil ПТСХ-П-А» размерами 10x10 см и 10x20 см, предварительно зачистив края по бокам пластин на 1-2 мм. Также в качестве стандартов используют фталеины аналогичного строения: фенолфталеин (Ф.Ф.), о-крезолфталеин (К.Ф.) и флуоресцеин. Элюирование пластин осуществляли в двух системах элюентов толуол-этанол-триэтиламин (9:1:1) и толуол-метанол-уксусная кислота (10:2:1) на высоту 90 мм от линии старта, после чего пластины высушиваются в токе теплого воздуха. Детектирование хроматографических зон

на полученных хроматограммах осуществляют при их осмотре в свете УФ-лампы (254 нм и 365 нм). Детектирование остальных хроматографических зон проводят двумя путями при помощи обработки пластин спиртовым 5%-ным раствором щелочи и обработкой пластин концентрированной серной кислотой. Полученные хроматограммы объектов исследования сравнивают между собой по цвету, форме и значениям R_f , выявленных хроматографических зон и сравнивают со стандартами.

Было обнаружено, что R_f синтезированных образцов практически в 2 раза меньше значения R_f стандартов, но при этом цвета выявленных хроматографических зон остаются такими же, как и у фталеинов аналогичного строения. Эффективность разделения продуктов реакции зависит от используемого элюента.

По результатам ТСХ каждый образец полученного пиромеллитового индикатора содержал большое количество примесей (от 2 до 4 пятен в каждом образце).

Для получения электронных (УФ) спектров синтезированных кислотно-основных маркеров, навеску кристаллических и смолообразных веществ около 1 мг растворяют в 95%-ном — этиловом спирте и проводят съемку в нейтральной и щелочной средах. В спиртовой раствор пиромеллитовых индикаторов прибавляют 2 капли 5%-ного КОН и снимают спектры окрашенных растворов. Съемку проводят при помощи двухлучевого спектрофотометра «Shimadzu UV-2600» в диапазоне от 185 до 800 нм; для снятия базовой линии использовали чистый этиловый спирт (95%). Результаты обрабатывали при помощи программы «UVProbe». В качестве образцов сравнения были сняты электронные спектры фенолфталеина (Ф.Ф.), о-крезолфталеина (К.Ф.), тимолфталеина (Т.Ф.) и флуоресцеина в нейтральной и щелочной средах.

На электронных (УФ) спектрах синтезированных в нейтральной и щелочной средах в области до 260 нм максимумы пиков незначительно сдвинуты в менее коротковолновую область, а после 260 нм — в длинноволновую область по сравнению с пиками стандартных фталеинов аналогичного строения, что связано с большей цепью сопряжения в пиромеллитовых индикаторах, а также с наличием примесей в синтезированных образцах.

Количество пиков и их интенсивность в спектрах синтезированных индикаторов и фталеинов аналогичного строения в основном совпадают, незначительные различия, возможно, связаны с наличием примесей в синтезированных образцах.

ИК-спектры синтезированных соединений получали при помощи ИК-Фурье спектрометра «Thermo Scientific Nicolet iS10» методом однократно нарушенного полного внутреннего отражения (ОНПВО), кривые обрабатывали при помощи программы «OMNIC».

При сравнении ИК-спектров синтезированных образцов со спектрами фенола и ПМДА, видно, что характеристические полосы поглощения совпадают, а интенсивность поглощения карбонильных групп в области $1685\text{--}1760\text{ см}^{-1}$ в полученных образцах уменьшена по сравнению со спектром ПМДА. Наблюдается широкая полоса поглощения в области $3400\text{--}3600\text{ см}^{-1}$ гидроксильных групп фенолов, связанных водородными связями, а интенсивность полос поглощения в области $1500\text{--}1600\text{ см}^{-1}$ ароматического кольца снижена по сравнению со спектром фенола. Во всех ИК-спектрах синтезированных веществ обнаружены характеристические полосы поглощения, соответствующие пиромеллитовым индикаторам.

Синтезированные образцы были исследованы на дифференциальном сканирующем калориметре «Mettler Toledo DSC822e» в атмосфере аргона в диапазоне температур от 25°C до 550°C со скоростью нагрева 5°C в минуту. Полученные диаграммы ДСК обрабатывали при помощи программы «STARe».

По данным дифференциальной сканирующей калориметрии, температуры разложения синтезированных веществ лежат в широком интервале температур от 200°C до 380°C и из-за большого числа примесей и возможных побочных продуктов, образовавшихся в ходе реакций, трудно идентифицировать каждый из пиков кривых ДСК. Тем не менее, температуры плавления ПМДА $287\text{--}289^\circ\text{C}$, тримеллитовой кислоты (ТМК) $224\text{--}225^\circ\text{C}$,

пиромеллитовой кислоты (ПМК) 281–283°C (безводной), 276–278°C (2·H₂O), фталевой кислоты (ФК) 196–199°C, обнаружены практически в каждом исследуемом образце, что свидетельствует о наличии непрореагировавшего пиромеллитовогодиангирида, а также образовавшихся в ходе реакции кислот.

Последние пики на кривых ДСК в интервале температур 300–380°C можно идентифицировать как пики пиромеллитовых индикаторов, поскольку эти соединения обладают большей молекулярной массой, а значит, их температуры плавления должны быть выше на 50–100°C, чем у фталеинов аналогичного строения

Анализ термограмм показывает, что плавление всех продуктов реакции сопровождается уменьшением массы вещества, т.е. происходит деструкция. Количество эндотермических пиков соответствует числу компонентов в смеси. Деструкция ПМДА, ПМК и пиромеллитовых индикаторов начинается с отщепления CO, CO₂ и H₂O (рис. 3).

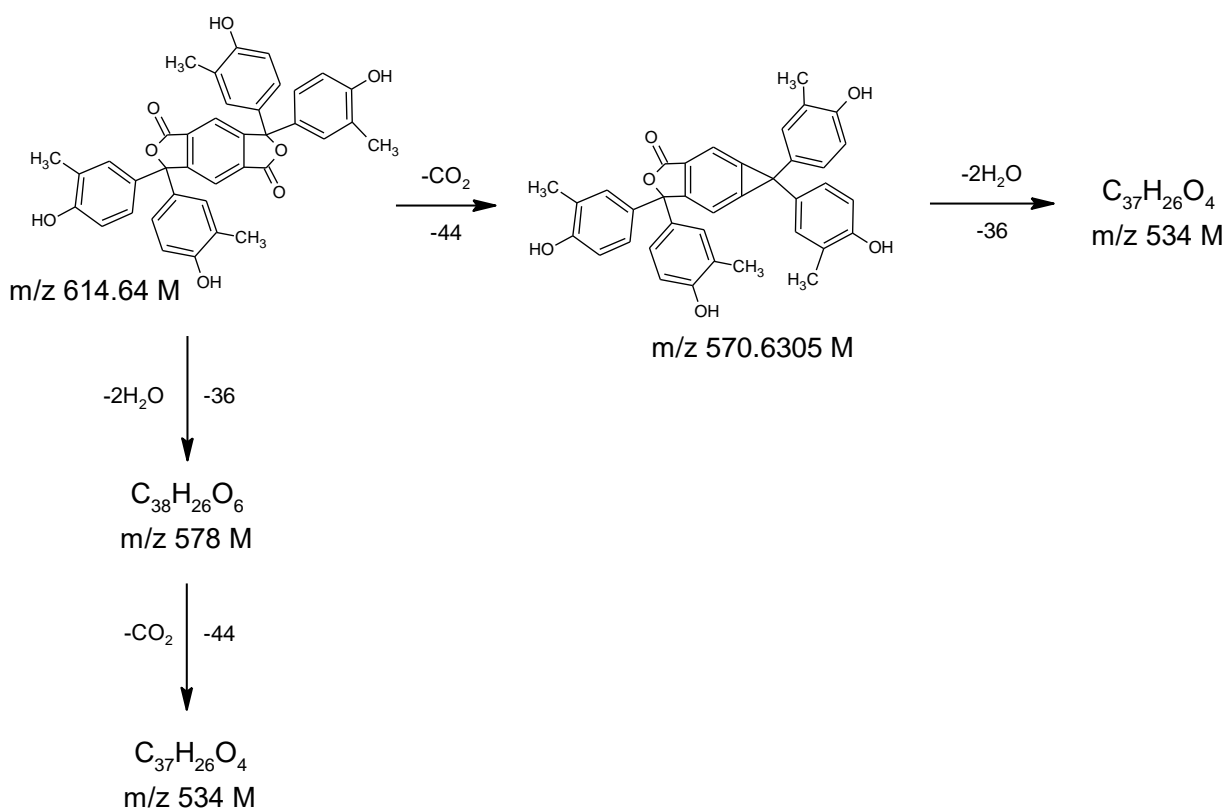


Рис. 3. — Основные направления распада пиромеллитинов, на примере о-крезолпиромеллитина.

Анализ синтезированных веществ проводился на жидкостном хроматографе «Ultimate 3000» колонка «Agilent Zorbax C18 4,6x100 мм, 5 мкм) с масс-спектрометрическим детектором API 2000 с положительной электрораспылительной ионизацией. Обработка результатов проводилась с помощью программы Analyst 1,5.

По результатам высокоэффективной жидкостной хроматографии — масс-спектропии в исследуемых образцах, были обнаружены молекулярные ионы, соответствующие молекулярным массам синтезируемых пиромеллитовых индикаторов.

Интервалы перехода пиромеллитовых индикаторов определяли кислотно-щелочным титрованием при постоянном измерении значения pH. Навеску 0,05 г синтезированных индикаторов растворяли в 50 мл дистиллированной воды и титровали 0,2 М КОН до изменения окраски раствора.

Интервалы перехода пиромеллитовых индикаторов по сравнению с фталеинами аналогичного строения [3] смещены в кислую область и находятся в нейтральных значениях рН, а проявляемая в щелочной и кислой средах окраска пиромеллитинов соответствует окраске фталеинов аналогичного строения.

При анализе полученных данных методами ТСХ, УФ, ИК, ДСК и ВЭЖХ/МС, можно точно установить, что во всех синтезах, были синтезированы пиромеллитовые индикаторы, а также ряд побочных смолообразных продуктов и изомеров различного строения.

Выводы

Проведены поисковые исследования по синтезу пиромеллитовых индикаторов с использованием реакции конденсации ПМДА с фенолами различного строения. Подобраны оптимальные условия синтеза, с использованием в качестве катализатора безводного $ZnCl_2$ при температурах реакции от 120 до 210°C и временем контакта от 3 до 6 часов. Выход пиромеллитовых индикаторов составляет 20–80%, целевые продукты необходимо очищать от примесей. Методами УФ- и ИК-спектроскопии, ВЭЖХ/МС и ДСК установлено строение 7 пиромеллитовых индикаторов.

Литература

1. Борщенко В. П., Махиянов Г. Ф. Пиромеллитовый диангидрид, получение и применение // тематические обзоры. Сер. «Нефтехимия и сланцепереработка», М., ЦНИИТ Энефтехим, 1974. — 80 с.
2. Нехорошев С. В., Нехорошев В. П., Поleshuk О. Х., Яркова А. Г., Нехорошева А. В., Гаспарян А. К. Новые химические маркеры на основе фталеинов // Журнал прикладной химии. — 2015. — Т.88, Вып. 4. 665–672 с.
3. Бишоп Э. Индикаторы. Том 1 / Перевод с английского Матвеева И. В. — М., Химия, 1976. — 483 с.

SYNTHESIS OF PYROMELLITEIN INDICATORS BASED ON PYROMELLITIC DIANHYDRIDE

Gasparyan A.K.¹, **Nekhoroshev S.V.**², **Nekhoroshev V.P.**¹, **Knyazev A.S.**³,
Kakova D.A.³

1 — Surgut State University

2 — The Khanty-Mansiysk State Medical Academy

3 — Tomsk State Research University

Abstract. The exploratory research has been carried out towards the synthesis of pyromellitein indicators employing the condensation between PMDA with different phenols. The optimal synthetic conditions were found, using $ZnCl_2$ as a catalyst within the reaction temperatures ranging from 120 to 210 °C and a contact time of 3 to 6 hours. The yield of pyromellitein indicators ranged from 20 to 80%. The target compounds must be purified from impurities. The structures of 7 pyromellitein indicators were confirmed by UV and IR spectroscopy, HPLC / MS and DSC.

Keywords: synthesis of pyromellitein indicators, condensation reaction, optimal synthetic conditions, IR spectrometry, differential scanning calorimetry.

References

1. Borshchenko V.P, Makhiyanov G.F. Pyromellitic dianhydride, production and application // thematic reviews. Ser. "Petrochemistry and slate processing", Moscow, TsNIITeneftkhim, 1974. - 80 p.
2. Nekhoroshev S.V., Nekhoroshev V.P., Poleshchuk O.H., Yarkova A.G., Nekhorosheva A.V., Gasparyan A.K. New chemical markers based on phthalates // Journal of Applied Chemistry. — 2015.-T.88, Iss. 4. 665-672 p.
3. Bishop E. Indicators. Volume 1 / Translated from English Matveeva I.V. — M., Chemistry, 1976. — 483 p.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ / BIOLOGY

УДК: 633.822: 577.19

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА *Hyssopus officinalis* L.

О. А. Гребенникова, А. Е. Палий, Л. А. Хлыпенко, В. Д. Работягов

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад
— Национальный научный центр» Российской академии наук
Республика Крым, г. Ялта, пгт. Никита*

В статье приведены данные о качественном и количественном составе ряда биологически активных веществ (летучих соединений, фенольных веществ, витаминов) водно-этанольного экстракта *Hyssopus officinalis* L. сорта Никитский Белый селекции Никитского ботанического сада — Национального научного центра РАН (далее НБС-ННЦ). Концентрация летучих соединений в водно-этанольном экстракте иссопа лекарственного находится на уровне 600 мг/100 г. В экстракте обнаружено 38 компонентов, идентифицировано — 32. Установлено, что среди летучих веществ преобладают монотерпеновые кетоны (81,6 % (отн.)) и монотерпены (7,32 % (отн.)). Основные летучие соединения экстракта иссопа лекарственного — пинокамфон, изопинокамфон и β -пинен. Содержание фенольных веществ в водно-этанольном экстракте иссопа лекарственного составило 592,1 мг/100 г. В экстракте обнаружено 17 компонентов. Среди фенольных веществ экстракта иссопа лекарственного доминирует розмариновая кислота (169,2 мг/100 г). Определено содержание аскорбиновой кислоты (9,50 мг/100 г) и каротиноидов (0,66 мг/100 г). Сделан вывод о возможности использования экстракта для создания пищевой и лечебно-профилактической продукции.

Ключевые слова: лекарственные растения, *Hyssopus officinalis* L., хроматография, масс-спектрометрия, летучие соединения, фенольные вещества, витамины.

Введение

Иссоп лекарственный (*Hyssopus officinalis* L.) — ценное пряно-ароматическое, лекарственное и эфиромасличное растение, относящееся к семейству яснотковые (Lamiaceae). В диком виде произрастает в Центральной и Южной Европе, Западной Азии и Северной Африке [1, 2]. В настоящее время иссоп лекарственный широко применяется в народной медицине практически во всем мире и включен в фармакопеи ряда европейских стран [3].

Известно, что в фазе цветения надземная масса иссопа лекарственного содержит до 1,5% эфирного масла в пересчете на сухой вес [4]; флавоноиды (апигенин, лютеолин, кверцетин), их гликозиды и фенольные кислоты (хлорогеновая, протокатеховая, феруловая сиреневая, *n*-гидроксibenзойная кофейная, ванилиновая, *n*-кумаровая, розмариновая и гентизиновая) [2]; витамин С и каротин [5], наряду со многими другими веществами. Особый интерес представляет эфирное масло иссопа лекарственного, которое получают во многих странах мира [6]. Химический состав эфирного масла иссопа лекарственного изучали в различных частях света и по результатам большинства исследований основными компонентами являются пинокамфон и изопинокамфон [1–4, 6–11]. Компонентный состав эфирного масла и количественное содержание различных соединений отличаются в зависимости от почвенно-климатических и генетических факторов [12]. Тем не менее, основные, характерные для данного растения компоненты: пинокамфон, изопинокамфон, β -

пинен, сабинен, мирцен, β -фелландрен, линалоол, миртенол, элемол и гермакрен-D [1, 3, 4, 8, 11]. Также в Иране произрастают тимольный и метилацетатный хемотипы иссопа лекарственного [13, 14].

Растительное сырьё и эфирное масло иссопа используют в парфюмерно-косметической (ароматические компоненты духов, косметики, мыла), пищевой (пряность и душистая приправа для ароматизации холодных закусок, мясных и рыбных блюд, соусов, алкогольных напитков) и фармацевтической промышленности [1, 2, 8, 14]. Иссоп обладает прекрасными фитонцидными свойствами и декоративностью [12].

Использование зелени иссопа в пищу способствует пищеварению, повышает аппетит, тонизирует организм, действует как общеукрепляющее средство. Фитосырьё иссопа используют при бронхитах, катарах верхних дыхательных путей, бронхиальной астме, стенокардии, неврозах, заболеваниях суставов, хронических колитах, метеоризме, диабете, как противоглистное средство, а также как антисептик. Наружно используют настои и отвары для промывания глаз, при стоматитах, заболеваниях носоглотки, для компрессов при кровоизлияниях, ушибах и как ранозаживляющее средство [1, 2, 10, 12, 14].

В связи с этим, актуальна интродукция и селекция иссопа лекарственного в условиях Крыма, а также изучение его биологически активных веществ. В Никитском ботаническом саду ведется работа по выведению новых сортов иссопа лекарственного, среди которых по ряду хозяйственно-ценных признаков (засухоустойчивый, позднеспелый, урожайность сырья 113,9 ц/га, массовая доля эфирного масла 0,45% от сырой массы, сбор эфирного масла 51,3 кг/га [15]) был выделен 'Никитский Белый'.

Таким образом, целью настоящей работы явилось изучение особенностей качественного и количественного состава биологически активных веществ (летучих соединений, фенольных веществ, витаминов) иссопа лекарственного сорта Никитский Белый селекции НБС — ННЦ для обоснования возможности его использования в качестве сырья для фармацевтической, пищевой и косметической промышленности.

Материалы и методы

Объектом исследования явилось сырьё иссопа лекарственного (*Hyssopus officinalis* L.) сорта Никитский Белый, собранного на коллекционных участках Никитского ботанического сада в период цветения.

Идентификацию и оценку содержания летучих веществ проводили из водно-этанольного экстракта, приготовленного из воздушно-сухого растительного сырья. Экстракцию проводили 50 %-ным раствором этанола при соотношении сырья (размер частиц 5 мм) к растворителю 1 : 10 3-кратным настаиванием в течение 10 суток (7 суток — первое настаивание, 2 суток — второе и 1 сутки — третье) при комнатной температуре. Идентификацию основных компонентов и оценку содержания летучих веществ проводили с помощью хроматографа Agilent Technology 6890 с масс-спектрометрическим детектором 5973. Использовали колонку HP-1 длиной 30 м и внутренним диаметром 0,25 мм. Температура термостата программировалась от 50 до 250⁰С со скоростью 4⁰С/мин. Температура инжектора — 250⁰С. Газ носитель — гелий, скорость потока 1 см³/мин. Перенос от газового хроматографа к масс-спектрометрическому детектору прогревался до 230⁰С. Температура источника поддерживалась на уровне 200⁰С. Электронная ионизация проводилась при 70 eV в ранжировке масс m/z от 29 до 450. Идентификация компонентов выполнялась на основе сравнения полученных масс-спектров с данными комбинированной библиотеки NIST05-WILEY2007 (около 500000 масс-спектров). Оценка содержания основных компонентов проводили методом простой нормализации, приняв за 100 % суммарную площадь хроматографических пиков. Оценка содержания суммы летучих веществ проводили путём сравнения с откликом внутреннего стандарта известной концентрации.

Компонентный состав фенольных веществ определяли на хроматографе фирмы Agilent Technologies (модель 1100), укомплектованном проточным вакуумным дегазатором G1379A, 4-канальным насосом градиента низкого давления G13111A, автоматическим инжектором G1313A, термостатом колонок G13116A, диодноматричным детектором G1316A. Для проведения анализа была использована хроматографическая колонка ZORBAX-SB C-18 размером 2,1×150 мм, заполненная октадецилсилильным сорбентом зернением 3,5 мкм. При анализе применяли градиентный режим хроматографирования, предусматривающий изменение в элюирующей смеси соотношения компонентов А (0,1 % ортофосфорная кислота; 0,3 % тетрагидрофуран; 0,018 % триэтиламин) и В (метанол). Скорость подачи подвижной фазы составила 0,25 см³/мин; рабочее давление элюента — 240–300 кПа; объем пробы — 2 мкл; время сканирования — 0,5 с; масштаб измерений 1,0. Идентификацию фенольных веществ проводили по времени удерживания стандартов (кофейная и розмариновая кислоты) и спектральным характеристикам (параметры снятия спектра — каждый пик 190–600 нм; фактор подобия спектров не менее 99,9). Для количественного определения применяли метод внешнего стандарта, детектирование осуществляли на длине волны 330 нм. [16, 17].

Суммарное содержание фенольных веществ определяли фотометрическим методом с использованием реактива Фолина-Чокальтеу [18], каротиноидов — фотометрическим методом [19], аскорбиновой кислоты йодометрическим титрованием [20].

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований установлено, что содержание летучих соединений в водно-этанольном экстракте иссопа лекарственного сорта Никитский Белый составила порядка 600 мг на 100 г воздушно-сухого растительного сырья. В экстракте обнаружено 38 компонентов, из которых идентифицировано 32 (табл. 1).

Таблица 1

**Компонентный состав летучих соединений водно-этанольного экстракта
Hyssopus officinalis L.**

№	Время выхода, мин	Компонент	Относительное содержание, % (отн)
1	2	3	4
1	5.51	α-пинен	0,51
2	6.60	β-пинен	4,16
3	6.96	мирцен	0,78
4	8.04	β-фелландрен	1,33
5	8.70	цис-оцимен	0,54
6	9.06	транс-сабиненгидрат	0,12
7	10.03	линалоол	0,49
8	10.51	α-гуйон	0,12
9	10.92	β-гуйон	0,07
10	11.97	пинокамфон	78,22
11	12.78	изопинокамфон	3,21
12	13.05	миртеналь	1,41
13	13.53	миртенол	0,99
14	15.20	не идентифицирован	0,38
15	16.79	внутренний стандарт	1,63
16	19.24	β-бурбонен	0,38
17	19.80	метилэвгенол	0,15

Продолжение таблицы 1.

18	20.07	β-кариофиллен	0,37
19	20.84	не идентифицирован	0,32
20	20.98	аромадендрен	0,30
21	21.41	гермакрен D	0,88
22	21.71	бициклогермакрен	0,22
23	22.72	элеamol	0,50
24	23.22	спатуленол	0,26
25	23.32	кариофилленоксид	0,12
26	24.97	не идентифицирован	0,11
27	26.46	не идентифицирован	0,05
28	26.78	не идентифицирован	0,08
29	26.89	не идентифицирован	0,16
30	27.09	гексагидрофарнезилацетон	0,06
31	28.59	пальмитиновая кислота	0,48
32	28.95	этил пальмитат	0,48
33	30.36	фитол	0,28
34	30.59	линолевая кислота	0,07
35	30.67	олеиновая кислота	0,25
36	30.89	этил линолеат	0,12
37	30.97	этил линоленат	0,27
38	31.23	этилстеарат	0,04
39	38.01	холеста-3,5-диен	0,54

В водно-этанольном экстракте данного сорта по содержанию преобладают монотерпеновые кетоны (81,6 % (отн.)) и монотерпены (7,3 % (отн.)). Доминирующими компонентами экстракта являются пинокамфон (78,2 % (отн.)), изопинокамфон (3,2 % (отн.)) и β-пинен (4,2 % (отн.)), что коррелирует с литературными данными для эфирного масла *Hyssopus officinalis* L. и характерно для данного вида в целом [1–3, 4, 8, 11]. Известно, что пинокамфон и β-пинен являются спазмолитиками, а β-пинен обладает бактерицидным действием [12]. Содержание каждого из остальных компонентов экстракта, за исключением β-фелландрена (1,3 % (отн.)) и миртенала (1,4 % (отн.)), не достигает 1,0 % (отн.). По количеству компонентов в экстракте выделяются сесквитерпены (2,1 % (отн.)), монотерпеновые спирты (1,6 % (отн.)), сложные эфиры (0,9 % (отн.)), органические кислоты (0,8 % (отн.)) и сесквитерпеновые спирты (1,8 % (отн.)), при этом их концентрации незначительны.

При исследовании фенольных соединений выявлено, что их содержание в водно-этанольном экстракте иссопа лекарственного сорта Никитский Белый составила 592,1 мг на 100 г воздушно-сухого растительного сырья (табл. 2).

Таблица 2

**Содержание гидроксикоричных кислот в водно-этанольном экстракте
Hyssopus officinalis L.**

№ п/п	Время выхода, мин	Компонент	Концентрация, мг/100 г сырья
1	24.86	кофейная кислота	10,6 ± 0,3
2	51.68	розмариновая кислота	169,2 ± 0,6

В экстракте обнаружено 17 компонентов, из которых идентифицировано и количественно определено 2, а для остальных сделано предположение о природе веществ. Экстракт содержит кофейную кислоту, розмариновую кислоту, а также потенциально богат производными хлорогеновой кислоты и лютеолина (по спектральным данным и литературному обзору) [2], рис.1.



Рис. 1. — Хроматограмма фенольных веществ водно-этанольного экстракта *Hissopus officinalis* L.

Среди фенольных соединений исследуемого иссопа преобладают гидроксикоричные кислоты, содержание которых составляет 72,5 % от суммы фенольных соединений. Доминирующим компонентом является розмариновая кислота, обладающая антиоксидантными, антибактериальными и противовирусными свойствами [21–23]. Кроме того, розмариновая кислота оказывает положительное терапевтическое действие при лечении бронхиальной астмы, воспалительных заболеваний, пептической язвы, атеросклероза, ишемической болезни сердца, катаракты, рака и др. [21, 22].

В экстракте изучаемого сорта иссопа лекарственного содержится 9,50 мг/100 г аскорбиновой кислоты и 0,66 мг/100 г каротиноидов.

Таким образом, водно-этанольный экстракт иссопа лекарственного сорта Никитский Белый содержит летучие соединения, доминирующими из которых являются пинокамфон, изопинокамфон и β -пинен, гидроксикоричные кислоты с преобладанием розмариновой кислоты, аскорбиновую кислоту и каротиноиды, что показывает целесообразность культивирования данного сорта для создания различных видов продукции с высокой биологической ценностью.

Выводы

1. Определён качественный и количественный состав ряда биологически активных веществ (летучих соединений, фенольных веществ, витаминов) водно-этанольного экстракта иссопа лекарственного сорта Никитский Белый.

2. По результатам оценки содержания летучих веществ экстракта их количество в 100 г воздушно-сухого растительного сырья составляет порядка 600 мг. Идентифицировано 32 летучих соединения экстракта, среди которых преобладают монотерпеновые кетоны и монотерпены. Выявлено, что фенольные вещества экстракта (592,1 мг на 100 г воздушно-сухого растительного сырья) представлены в основном гидроксикоричными кислотами (72,5 % от суммы фенольных веществ), среди которых доминирует розмариновая кислота. В экстракте определено содержание витаминов — аскорбиновой кислоты (9,50 мг/100 г) и каротиноидов (0,66 мг/100 г).

Проведенные исследования подтверждают целесообразность культивирования данного сорта для создания продукции с высокой биологической ценностью.

Литература

1. Wesołowska A., Jadczyk D., Grzeszczuk M. Essential oil composition of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) cultivated in north-western Poland // *Herba polonica* — 2010 — Vol. 56 — No 1 — P. 57–65.
2. Fathiazad F., Hamedeyazdan S. A review on *Hyssopus officinalis* L.: Composition and biological activities // *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 2011. Vol. 5(17). P. 1959–1966.
3. Мяделец М. А., Домрачев Д. В., Черемушкина В. А. Исследование химического состава эфирных масел некоторых видов семейства *Lamiaceae* L., культивируемых в условиях Западной Сибири // *Химия растит. сырья.* 2012. № 1. С. 111–117.
4. Zawisłak G. Morphological characters of *Hyssopus officinalis* L. and chemical composition of its essential oil // *Modern Phytomorphology.* 2013. Vol. 4. P. 93–95.
5. Котюк Л. А. Вміст аскорбінової кислоти і каротину у сировині пряно-ароматичних рослин родини *Lamiaceae* Lindl. // *Біологічні Студії.* 2013 Том 7, №2 С. 83–90.
6. Шибко А. Н., Аксенов Ю. Динамика накопления эфирного масла и изменчивость его компонентного состава в течение суток у *Hyssopus officinalis* в условиях предгорного Крыма // *Экосистемы, их оптимизация и охрана.* 2011. Вып. 4. С. 127–133.
7. Котюк Л. А. Біохімічний склад інтродуцента *Hyssopus officinalis* L. залежно від сортових особливостей // *Вісник Львівського університету. Серія біологічна.* 2013. Вип. 62. С. 302–308.
8. Mitić V., Đorđević S. Essential oil composition of *Hyssopus officinalis* L. cultivated in Serbia // *Facta universitatis Series: Physics, Chemistry and Technology.* — 2000. — Vol. 2, No 2. — P. 105–108.
9. Moghtader M. Comparative evaluation of the essential oil composition from the leaves and flowers of *Hyssopus officinalis* L. // *J. Hortic. For.* — 2014. — Vol. 6(1). — P. 1–5.
10. Soleimani H., Barzegar M., Sahari M.A., Naghdi B.H. An investigation on the antioxidant activities of *Hyssopus officinalis* L. and *Echinacea purpurea* L. plant extracts in oil model system // *J. of Med. Plants.* — 2011. — Vol. 10, No. 37. — P. 61–72.
11. Schulz G, Stahl E. Essential oils and glycosidic-bound volatiles from leaves, stems, flowers and roots of *Hyssopus officinalis* L. *Flavor and Fragrance J.* 1991. Vol. 6(1). P. 69–73.
12. Jankovský M., Landa T. Genus *Hyssopus* L. — recent knowledge // *Hort. Sci. (Prague).* 2002. Vol. 29, No. 3. P. 119–123.
13. Dehghanzadeh N., Ketabchi S., Alizadeh A. Essential oil composition and antibacterial activity of *Hyssopus officinalis* L. grown in Iran // *Asian J. Exp. Biol. Sci.* 2012. Vol. 3(4). P. 767–771.

14. Fathiazad F., Mazandarani M., Hamedeyazdan S. Phytochemical analysis and antioxidant activity of *Hyssopus officinalis* L. from Iran // *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2011. Vol. 1(2). P. 63–67.
15. Работягов В. Д., Хлыпенко Л. А., Свиденко Л. В., Логвиненко И. Е., Логвиненко Л. А. Новые сорта ароматических и лекарственных растений селекции Никитского ботанического сада // *Труды Никитского ботанического сада*. 2011. Том 133. С. 5–17.
16. Court W.A. HP reverse phase LC of naturally occurring phenolic compounds // *J. Chromatogr.* 1977. V. 130. P. 287–291.
17. Murrough M.I., Hennigan G.P., Loughrey M.J. Quantitative analysis of hop flavonols using HPLC // *J. Agric. Food Chem.* 1982. V. 30. P. 1102–1106.
18. Методы теххимического контроля в виноделии Под ред. Гержиковой В.Г. Симферополь: Таврида, 2002. 259 с.
19. Плешков Б. П. Практикум по биохимии растений. М.: Колос, 1985. 256 с.
20. Кривенцов В. И. Методические рекомендации по анализу плодов на биохимический состав. Ялта, 1982. 22 с.
21. Murakami K., Haneda M., Qiao S. Prooxidant action of rosmarinic acid: Transition metal-dependent generation of reactive oxygen species // *Toxicology in Vitro*. 2007. № 21. P. 613–617.
22. Petersen M., Simmonds M.S.J. Rosmarinic acid // *Phytochemistry*. 2003. Vol. 62. P. 121–125.
23. Sanbongi C., Takanowz H., Osakabe N. Rosmarinic acid in perilla extract inhibits allergic inflammation induced by mite allergen, in a mouse model // *Clin Exp Allergy*. 2004. № 34. P. 971–977.

BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES OF *Hyssopus officinalis* L.

Grebennikova O.A., Paliy A.Y., Khlypenko L.A., Rabotyagov V.D.

*Federal State Budgetary Institution of Science "Order of the Red Banner of Labor Nikitsky Botanical Garden — National Science Center" of the Russian Academy of Sciences
Russia, Republic of Crimea, Yalta, Nikita.*

Abstract. This paper presents the data on qualitative and quantitative composition of a number of biologically active substances (volatile compounds, phenolic compounds and vitamins) in aqueous-ethanolic extract from *Hyssopus officinalis* L. Nikitskiy Belyiy variety bred in Nikitsky Botanical Garden — National Scientific Center (hereafter referred to as NBS–NSC). The concentration of volatile compounds in the aqueous-ethanolic extract of common hyssop is about 600 mg/100 g. 38 components have been determined in the extract, 32 of them have been identified. It has been found that monoterpene ketones (81.6 % (rel.)) and monoterpenes (7.3 % (rel.)) predominate among volatile substances. The main volatile compounds of the common hyssop extract are pinocampone, iso-pinocampone and β -pinene. The total phenolics content in the aqueous-ethanolic extract of the common hyssop was 592.1 mg/100 g. 17 components have been determined in the extract. Rosmarinic acid (169.2 mg/100 g) dominates among phenolic compounds of the common hyssop extract. The content of ascorbic acid (14,54 mg/100 g) and carotenoids (5,19 mg/100 g) has been quantified. A conclusion about the possibility of using the extract for developing food, therapeutic and prophylactic products is made.

Keywords: medicinal herbs, *Hyssopus officinalis* L., aqueous-ethanolic extract, chromatography, mass spectrometry, volatile compounds, phenolic compounds, vitamins.

References

1. Wesółowska A., Jadczyk D., Grzeszczuk M. Essential oil composition of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) cultivated in north-western Poland // *Herba polonica* — 2010 — Vol. 56 — No 1 — P. 57–65.
2. Fathiazad F., Hamedeyazdan S. A review on *Hyssopus officinalis* L.: Composition and biological activities // *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 2011. Vol. 5(17). P. 1959–1966.
3. Mjadelec M.A., Domrachev D.V., Cheremushkina V.A. Issledovanie himicheskogo sostava efirnyh masel nekotoryh vidov semejstva Lamiaceae L., kul'tiviruemyh v uslovijah Zapadnoj Sibiri // *Himija rastit.syr'ja*. 2012. № 1. P. 111–117. (*in Russian*)
4. Zawislak G. Morphological characters of *Hyssopus officinalis* L. and chemical composition of its essential oil // *Modern Phytomorphology*. 2013. Vol. 4. P. 93–95.
5. Kotjuk L. A. Vmist askorbinovoi kisloty i karotynu u syrovyni prjano-aromatychnyh roslyn rodyny Lamiaceae Lindl. // *Biologichni Studii*. 2013 Tom 7, №2, P. 83–90. (*in Ukrainian*)
6. Shibko A. N., Aksenov Ju. Dinamika nakoplenija jefirnogo masla i izmenchivost' ego komponentnogo sostava v techenie sutok u *Hyssopus officinalis* v uslovijah predgornogo Kryma // *Jekosistemy, ih optimizacija i ohrana*. 2011. Vyp. 4. P. 127–133. (*in Russian*)
7. Kotjuk L. A. Biohimichnij sklad introducenta *Hyssopus officinalis* L. zalezno vid sortovih osoblivostej // *Visnik L'vivskogo universitetu. Serija biologichna*. 2013. Vip. 62. P. 302–308. (*in Russian*)
8. Mitić V., Dorđević S. Essential oil composition of *Hyssopus officinalis* L. cultivated in Serbia // *Facta universitatis Series: Physics, Chemistry and Technology*. — 2000. — Vol. 2, No 2. — P. 105–108.
9. Moghtader M. Comparative evaluation of the essential oil composition from the leaves and flowers of *Hyssopus officinalis* L. // *J. Hortic. For.* — 2014. — Vol. 6(1). — P. 1–5.
10. Soleimani H., Barzegar M., Sahari M.A., Naghdi B.H. An investigation on the antioxidant activities of *Hyssopus officinalis* L. and *Echinacea purpurea* L. plant extracts in oil model system // *J. of Med. Plants*. — 2011. — Vol. 10, No. 37. — P. 61–72.
11. Schulz G, Stahl E. Essential oils and glycosidic-bound volatiles from leaves, stems, flowers and roots of *Hyssopus officinalis* L. *Flavor and Fragrance J.* 1991. Vol. 6(1). P. 69–73.
12. Jankovský M., Landa T. Genus *Hyssopus* L. — recent knowledge // *Hort. Sci. (Prague)*. 2002. Vol. 29, No. 3. P. 119–123.
13. Dehghanzadeh N., Ketabchi S., Alizadeh A. Essential oil composition and antibacterial activity of *Hyssopus officinalis* L. grown in Iran // *Asian J. Exp. Biol. Sci.* 2012. Vol. 3(4). P. 767–771.
14. Fathiazad F., Mazandarani M., Hamedeyazdan S. Phytochemical analysis and antioxidant activity of *Hyssopus officinalis* L. from Iran // *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2011. Vol. 1(2). P. 63–67.
15. Rabotjagov V. D., Hlypenko L. A., Svidenko L. V., Logvinenko I. E., Logvinenko L. A. Novye sorta aromaticeskikh i lekarstvennyh rastenij selekcii Nikitskogo botanicheskogo sada // *Trudy Nikitskogo botanicheskogo sada*. 2011. Tom 133. P. 5–17. (*in Russian*)
16. Court W.A. HP reverse phase LC of naturally occurring phenolic compounds // *J. Chromatogr.* 1977. V. 130. P. 287–291.
17. Murrough M.I., Hennigan G.P., Loughrey M.J. Quantitative analysis of hop flavonols using HPLC // *J. Agric. Food Chem.* 1982. V. 30. P. 1102–1106.
18. *Metody tehnohimicheskogo kontrolja v vinodelii* Pod red. Gerzhikovej V.G. Simferopol': Tavrida, 2002. 259 p. (*in Russian*)
19. Pleshkov B.P. *Praktikum po biohimii rastenij*. M.: Kolos, 1985. 256 p. (*in Russian*)
20. Krivencov V.I. *Metodicheskie rekomendacii po analizu plodov na biohimicheskij sostav*. Jalta, 1982. 22 p. (*in Russian*)
21. Murakami K., Haneda M., Qiao S. Prooxidant action of rosmarinic acid: Transition metal-dependent generation of reactive oxygen species // *Toxicology in Vitro*. 2007. № 21. P. 613–617.
22. Petersen M., Simmonds M.S.J. Rosmarinic acid // *Phytochemistry*. 2003. Vol. 62. P. 121–125.
23. Sanbongi C., Takanowz H., Osakabe N. Rosmarinic acid in perilla extract inhibits allergic inflammation induced by mite allergen, in a mouse model // *Clin Exp Allergy*. 2004. № 34. P. 971–977.

УДК: 616-092

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ КОЛИЧЕСТВА мРНК РЕЦЕПТОРА КОРТИКОЛИБЕРИНА ВТОРОГО ТИПА В ГИППОКАМПЕ У ХРОНИЧЕСКИ АЛКОГОЛИЗИРОВАННЫХ КРЫС В УСЛОВИЯХ АБСТИНЕНЦИИ

М. И. Айрапетов^а, С. О. Ереско^б

а — Институт экспериментальной медицины,

г. Санкт-Петербург

б — Санкт-Петербургский государственный университет,

г. Санкт-Петербург

Хроническая алкогольная интоксикация характеризуется снижением контроля над количеством выпиваемого алкоголя, а также ростом толерантности к нему. Известно, что в механизмах развития вовлечены рецепторы кортиколиберина второго типа (CRF-R2). Показано, что CRF-R2 локализируются в гиппокампе. В ходе исследования мы оценили характер изменений количества мРНК CRF-R2 в гиппокампе при абстинентном синдроме и получили данные, что количество мРНК рецепторов кортиколиберина второго типа в гиппокампе хронически алкоголизированных крыс в условиях отмены алкоголя на первые и седьмые сутки имеет тенденцию к увеличению. Полученные результаты свидетельствуют о дисрегуляции обмена нейромедиаторов в области гиппокампа, что позволяет предположить о возникновении когнитивных дисфункций в организме, влекущих за собой снижение контроля над количеством употреблённого алкоголя.

Ключевые слова: рецепторы кортиколиберина, мРНК, алкоголизм, гиппокамп

Введение

Хроническая алкогольная интоксикация (ХАИ) представляет собой заболевание, которое характеризуется пристрастием к алкоголю, что выражается снижением контроля над количеством выпиваемого алкоголя, а также ростом толерантности к нему. В конечном итоге это приводит к развитию психической и физической зависимости от алкоголя у пациентов [9].

Согласно ряду исследований, при систематическом употреблении алкоголя в гиппокампе изменяется активность ряда генов [1, 6, 21]. Обнаружено, что в механизмах развития ХАИ могут принимать участие рецепторы кортиколиберина второго типа (CRF-R2) [8, 10, 12]. Известно, что CRF-R2 локализованы в гиппокампе [28]. Вместе с тем, в доступной нам литературе не было найдено работ, посвященных изучению динамики изменений уровня количества мРНК CRF-R2 в гиппокампе на фоне отмены алкоголя (абстинентный период) у хронически алкоголизированных животных. Таким образом, учитывая выше изложенное, представляет интерес оценить характер изменений количества мРНК CRF-R2 в гиппокампе при абстинентном синдроме в эксперименте.

Одним из актуальных направлений в изучении патологического влечения к алкоголю является выявление биологических факторов, которые оказывают влияние на уровень алкогольной мотивации. До сих пор биохимические и молекулярно-генетические механизмы, влияющие на степень влечения к алкоголю, остаются недостаточно изученными [2, 5, 7]. Предлагаются гипотезы, объясняющие врожденную склонность к потреблению алкоголя особенностями организации гипоталамо-гипофизарно-надпочечникового комплекса [20, 65, 67]. Возникновение когнитивных расстройств, вызванных употреблением алкоголя, сопровождается патологическим функционированием структур головного мозга,

связанных с процессом вознаграждения и стресс-систем организма, которые способствуют эскалации употребления алкоголя и тяги к нему [5, 10, 11].

Известно, что система кортиколиберина вовлечена в переход от периодического употребления алкоголя к развитию алкогольной зависимости [5, 10, 11]. В условиях хронической алкогольной интоксикации наблюдается дисрегуляция в количестве мРНК рецепторов кортиколиберина первого типа (CRF-R1). Однако о количестве мРНК CRF-R2 в структурах мозга крыс в литературе имеются весьма противоречивые сведения [8, 10, 11]. Фармакологические манипуляции, направленные на рецепторы кортиколиберина, могут быть перспективными инструментами для снижения патологического влечения к алкоголю, и связанной с ним тревогой, агрессией и поведенческой сенсibilизацией, а также для восстановления когнитивных дисфункций [10, 11].

Цели и задачи исследования

Цель работы — оценить количество мРНК рецепторов кортиколиберина второго типа (CRF-R2) в гиппокампе у хронически алкоголизованных крыс в период абстиненции.

Задачи исследования: определить количество мРНК CRF-R2 в гиппокампе при хронической интоксикации алкоголем (через 6 мес. алкоголизации); определить количество мРНК CRF-R2 в гиппокампе крыс у хронически алкоголизованных крыс в период отмены алкоголя на 1-ые и 7-ые сутки.

Материалы и методы

В работе были использованы 56 самцов половозрелых взрослых крыс линии Вистар в возрасте 3-4 месяца массой тела 200–250 грамм, полученных из питомника «Рапполово» РАМН (Санкт-Петербург, Ленинградская область, Россия).

В экспериментах с хронической алкоголизацией 42 крысы подвергли полунасилованной алкоголизации 15%-ным раствором этанола в качестве единственного источника жидкости в течение 6-ти месяцев при свободном доступе к брикетированному сухому корму. Контрольная группа состояла из 14 крыс и в качестве источника жидкости получала воду. Через 6 месяцев в группе алкоголизации 14 крыс декапитировали, 28 животных были вновь переведены на водный режим (условия абстиненции). В дальнейшем по 14 крыс декапитировали на первые и седьмые сутки абстиненции. Мозг выделяли на холоду. Образцы необходимой структуры мозга немедленно замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -80°C до проведения ПЦР-анализа.

Для биохимических тестов в данном исследовании использовали гиппокамп мозга крыс. Выделение тотальной РНК проводили из 20 мг пробы мозга с использованием реагента TRIzol («Ambion», США) в полном соответствии с инструкцией производителя. Мультиплексную ПЦР с детекцией в режиме реального времени проводили с помощью прибора «Mx3005P» («Stratagene», США) в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 1 мкл кДНК, 15 мкл. Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix и 2 пкМ каждого праймера (табл.1).

Для статистической обработки полученных количественных данных и построения графиков применяли пакеты программ Graph Pad Prizm v.4; SPSS Sigma Stat 3,0 и Minitab 14. В качестве непараметрического критерия для сравнения групп использовали критерий Краскела – Уоллиса. Различия считали статистически значимыми при значении $p < 0,05$.

Таблица 1

Структура праймеров для оценки уровня экспрессии гена рецептора кортиколиберина второго типа (CRF-R2)

Ген	Название праймера	Нуклеотидная последовательность
CRF-R2	прямой	5'-CACATGGGGCACTGAAGAGCA-3'
	обратный	5'-TGAGGGGCTCCAACAGACACA-3'

Результаты и обсуждение

Гиппокамп — структура головного мозга, расположенная во внутренней части височной области мозга (рис. 1). Гиппокамп по форме напоминает морского конька и функционально отвечает за формирование памяти, являясь важным отделом мозга, вовлечённым в хранении долгосрочной информации. Он входит в состав лимбической системы, связан с регуляцией эмоционального состояния организма и отвечает за ориентацию в пространстве. У человека два гиппокампа, расположенных по одному на каждой стороне мозга, связанных между собой нервными волокнами. В состав гиппокампа включают энторинальную кору, которая расположена в парагиппокампальной извилине. Энторинальная кора является связующим элементом между гиппокампом и корой головного мозга [21].

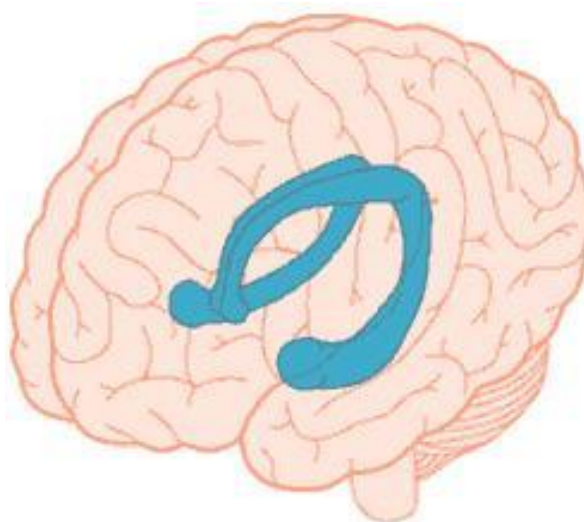


Рис.1. — Гиппокамп

Через гиппокамп проходят нейромедиаторные пути серотонина, дофамина и норадреналина, обладающие модулирующим действием. Входы от септальной зоны имеют важнейшее значение в контроле физиологического состояния гиппокампа. На некотором расстоянии от выхода в энторинальную кору располагаются выходы, направленные в различные корковые области, в том числе в префронтальную кору [21].

Известно, что употребление алкоголя ухудшает функции гиппокампа, включая память и синаптическую пластичность вследствие повреждения митохондрий [27]. ХАИ приводит к отрицательным последствиям для гиппокампа: снижается уровень белого вещества [14], число глиальных клеток, включая олигодендроциты, а также подавляется нейрогенез [3, 4, 22, 26]. В условиях ХАИ, пути, связанные с воспалением, гипоксией и стрессом организма активируются, а пути, которые принимают роль в нейрогенезе и миелинизации нейронов,

напротив, подавляются [21]. Показано, что комбинаторный эффект стресса и алкоголя оказывает вредное воздействие на гиппокамп, посредством запуска каскада реакций окислительного стресса [23]. Результаты исследований показывают, что у крыс, подвергнутых алкоголизации этанолом были получены изменения в памяти, сопровождающиеся ухудшением синаптической пластичности [27].

Выявлено, что существуют гены, играющие роль в развитии ХАИ, активность которых изменяется в гиппокампе при систематическом употреблении алкоголя. Так, существует более 600 генов, активность которых различается между алкоголиками и группой контроля. К таким генам относятся: FKBP5, UGT8, переносчик мочевины (SLC14A1), транспортер цинка (SLC39A10), рецептор интерлейкина-1 первого типа (IL1R1), TXNIP, гены глюкокортикоидных рецепторов, гены рецепторов грелина, кортиколиберина (CRF-R1, CRF-R2) [1, 21].

Наряду с этим, имеются данные об участии CRF-R2 в механизмах развития ХАИ. Известно, что CRF-R2 имеют локализацию в гиппокампе [28], однако изменение их активности в условиях отмены алкоголя на фоне хронической алкоголизации не изучалось. CRF-R2 имеет три варианта сплайсинга: CRF-R2 α , CRF-R2 β , CRF-R2 γ . CRF-R2 γ был обнаружен только у людей, а CRF-R2 α и CRF-R2 β были обнаружены у грызунов. У грызунов CRF-R2 β присутствует в периферических тканях, тогда как CRF-R2 α локализуется главным образом в головном мозге. В отличие от грызунов, у человека CRF-R2 α встречается в мозге и в периферических тканях, тогда как CRF-R2 β и CRF-R2 γ встречаются только в головном мозге [15]. Основные сайты экспрессии CRF-R2 включают в себя обонятельную луковицу, ядра боковой перегородки (BNST), ядра гипоталамуса, ядра амигдалы, вентральный гиппокамп, ряд других базальных ядер [28]. CRF-R2 идентифицирован в гипофизе крыс. Предполагается, что глюкокортикоиды участвуют в модулировании количества мРНК CRF-R2 в гипофизе в условиях стресса [18]. В условиях стресса количество мРНК CRF-R2 увеличивается, что проявляется тревожным состоянием и агрессией у мышей. Использование антагонистов CRF-R2 снижает тревожное расстройство у крыс [19]. Хроническое воздействие стресса или алкоголя может стимулировать процессы нейроадаптации, которые изменяют когнитивные функции, способствуя уменьшению когнитивного контроля над употреблением алкоголя [25]. Исследования показывают, что нейротоксичность в области гиппокампа также ведет к когнитивным дисфункциям [24].

В ходе проведенного нами исследования были получены результаты, представленные на рисунке 2.

Перевод хронически алкоголизованных крыс на водный режим имеет тенденцию к увеличению количества мРНК CRF-R2 на первый и седьмой день абстинентного периода по отношению к группе алкоголиков ($p \leq 0.05$), что свидетельствует об активации стресс-системы в организме крыс в период абстиненции. Активация стресс-системы приводит к дисфункциям обмена нейромедиаторов в области гиппокампа, что влечет за собой тревожное состояние, агрессивность и когнитивные нарушения [17,19], способствуя уменьшению когнитивного контроля над употреблением алкоголя. Полученные результаты свидетельствуют о сложности механизмов развития ответных реакций в период абстиненции в условиях хронической алкогольной интоксикации.

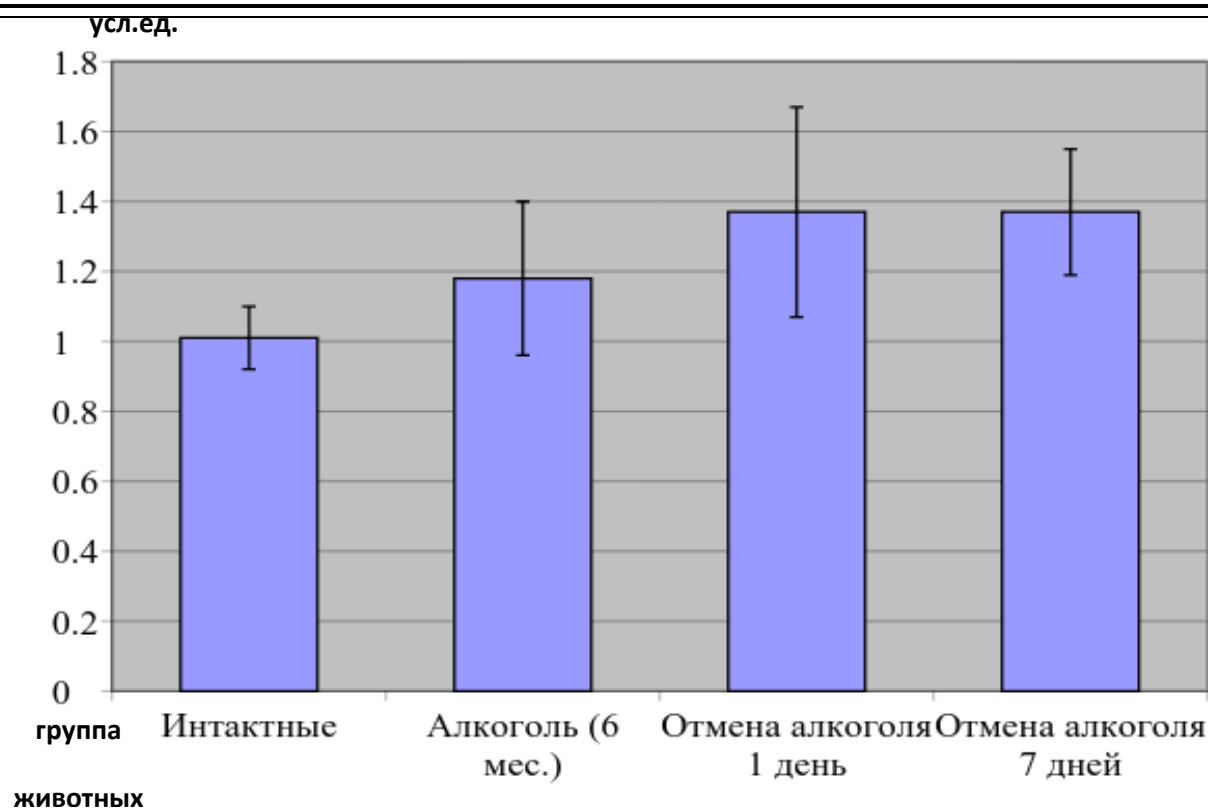


Рис. 2. — Динамика изменений количества мРНК рецептора кортиколиберина второго типа в гиппокампе крыс (усл.ед.).
(* $p \leq 0.05$ по отношению к группе алкоголизации в течение 6мес.)

Выводы

Хроническая алкогольная интоксикация имеет тенденцию к увеличению количества мРНК рецепторов кортиколиберина второго типа в гиппокампе хронически алкоголизированных крыс в условиях отмены алкоголя на первые и седьмые сутки, что свидетельствует об активации стресс-системы в организме крыс. Активация стресс-системы приводит к дисфункциям обмена нейромедиаторов в области гиппокампа, что влечет за собой тревожное состояние, агрессивность и когнитивные нарушения. Результаты настоящего исследования позволяют предположить, что на фоне возникновения когнитивных дисфункций в организме снижается контроль над количеством употребленного алкоголя, что приводит к увеличению частоты и дозы употребляемого алкоголя.

Литература

1. Айрапетов, М. И. Влияние хронической алкоголизации и отмены этанола на уровень экспрессии мРНК грелинового рецептора в мозге крыс. / М.И. Айрапетов, Э.А. Сексте, П.П. Хохлов и др. // Наркология. — 2013. — №9 (141). — С.61-65.
- 2а. Анохина И. П. Алкоголизм и эпигенетика / И. П. Анохина // Вопросы наркологии. — 2008. — №3. — С. 23-32.
- 2б. Анохина И. П. Руководство по наркологии / И. П. Анохина. — Москва: Медпрактика, 2002. — С. 33-42.
3. Богомолов Д. В. Танатологическая оценка морфологических изменений головного мозга при алкогольной болезни / Д. В. Богомолов, А. Л. Павлов, Г. Г. Семенов, В. В. Яковлев // Наркология. — 2006. — № 11. — С. 45-47.

4. Богомолова И. Н. Поражение печени при хронической наркотической интоксикации / И. Н. Богомолова, Д. В. Богомолов, Ю. Н. Пиголкин // Актуальные аспекты судебно-медицинской экспертизы. — Ижевск: экспертиза, 2000. — Вып.6. — С. 85-88.
5. Буров Ю. В. Нейрохимия и фармакология алкоголизма / Ю. В. Буров, Н. Н. Ведерникова, Н. А. Алиев — Москва: Медицина, 1991. — 239 с.
6. Ереско С. О., Айрапетов М. И. Дисрегулирующее токсическое действие этанола на формирование грелиновой системы у крыс // Молодой ученый. — 2017. — №20. — С. 166-168.
7. Иванец Н. Н. Смертность больных наркоманией в Российской Федерации. Анализ данных федерального наблюдения / Н. Н. Иванец, Е. А. Кошкина, В. В. Киржанова, В. М. Гуртовенко, Н. И. Павловская, В. А. Ходырев, В. А. Клевно, Е. М. Соломатин, Б. М. Лисянский // Вопросы наркологии. — 2008. — №3. — С. 105-118.
8. Сапронов Н. С. Гормоны гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы и мозг // СПб.: Элби-СПб, 2008. — 528с.
9. Шабанов П. Д. Наркология: практическое руководство для врачей / П.Д. Шабанов. — Москва: ГЭОТАР-МЕД, 2003. — 560 с.
10. Шабанов П. Д. Подкрепляющие системы мозга: локализация, нейрохимическая организация, участие в формировании зависимости от психостимуляторов / П.Д. Шабанов, А.А Лебедев // Психофармакол. и биол. наркол. — 2001. — Т 1. — №1. — С. 13-27.
11. Шабанов П. Д., Лебедев А. А., Русановский В. В., Стрельцов В. Ф. Поведенческие эффекты кортиколиберина и его аналогов, вводимых в желудочки мозга крыс // Мед. Акад. Журн. — 2005. — Т.5. — №3. — С. 4-9. 67
12. Шабанов П. Д., Лебедев А. А., Стрельцов В. Ф. Гормональные механизмы подкрепления // СПб.: Элби-СПб, 2008. — 272 с.
13. Becker H.C. Influence of stress associated with chronic alcohol exposure on drinking / H.C. Becker // *Neuropharmacology*. — 2017. — Aug 1. — P. 115-126.
14. Cantacorps L. Maternal alcohol binge drinking induces persistent neuroinflammation associated with myelin damage and behavioural dysfunctions in offspring mice / S. Alfonso-Loeches, M. Moscoso-Castro, J. Cuitavi, I. Gracia-Rubio, R. López-Arnau, E. Escubedo, C. Guerri, O. Valverde // *Neuropharmacology*. — 2017. — Sep 1 — P. 368-384.
15. Gounko N.V. Localization and functional roles of corticotropin-releasing factor receptor type 2 in the cerebellum / N.V. Gounko, A. Gramsbergen, J.J. Want // *Cerebellum*. — 2008. — V.7. — P. 4-8
16. Granholm L. The expression of opioid genes in non-classical reward areas depends on early life conditions and ethanol intake / L. Granholm, A. Todkar, S. Bergman, K. Nilsson, E. Comasco, I. Nylander // *Brain Res*. — 2017. — Aug 1. — P. 36-45.
17. Henricks A.M. Sex- and hormone-dependent alterations in alcohol withdrawal-induced anxiety and corticolimbic endocannabinoid signaling / A.M. Henricks, A.L. Berger, J.M. Lugo, L.N. Baxter-Potter, K.V. Bieniasz, G. Petrie, M.A. Sticht, M.N. Hill, R.J. McLaughlin // *Neuropharmacology*. — 2017. — Sep 1. — P. 121-133.
18. Kageyama K. Corticotropin-releasing factor receptor type 2 messenger ribonucleic acid in rat pituitary: localization and regulation by immune challenge, restraint stress, and glucocorticoids / K. Kageyama, C. Li, W.W. Vale // *Endocrinology*. — 2003. — Apr;144(4). — P. 1524-32.
19. Klampfl S.M. Hypoactivation of CRF receptors, predominantly type 2, in the medial-posterior BNST is vital for adequate maternal behavior in lactating rats / S.M. Klampfl, P.J. Brunton, D.S. Bayerl, O.J. Bosch // *J Neurosci*. — 2014. — Jul 16;34(29). — P. 9665-76.
20. Lê A.D. Role of κ -Opioid Receptors in the Bed Nucleus of Stria Terminalis in Reinstatement of Alcohol Seeking / A.D. Lê, D. Funk, K. Coen, S. Tamadon, Y. Shaham // *Neuropsychopharmacology*. — 2017. — Jun 7.

21. Matsumoto I. Proteomics approach in the study of the pathophysiology of alcohol-related brain damage // *Alcohol Alcohol.* — 2009. — №44. — P. 171-176.
22. Maynard M.E. Sex differences in hippocampal damage, cognitive impairment, and trophic factor expression in an animal model of an alcohol use disorder / M.E. Maynard, E.A. Barton, C.R. Robinson, J.I. Wooden, J.L. Leasure // *Brain Struct Funct.* — 2017. — Jul. 27.
23. Pant R. Cognitive deficits induced by combined exposure of stress and alcohol mediated through oxidative stress-PARP pathway in the hippocampus / R. Pant, A. Jangra, M. Kwatra, T. Singh, P. Kushwah, B.K. Bezbaruah, S.S. Gurjar, S. Phukan // *Neurosci Lett.* — 2017. — Jul 13. — P. 653:208-214.
24. Rajput P. Alcohol aggravates stress-induced cognitive deficits and hippocampal neurotoxicity: Protective effect of melatonin / P. Rajput, A. Jangra, M. Kwatra, A. Mishra, M. Lahkar // *Biomed Pharmacother.* — 2017. — Jul;91. — P. 457-466.
25. Rodberg E.M. Stress Facilitates the Development of Cognitive Dysfunction After Chronic Ethanol Exposure / E.M. Rodberg, C.R. Hartog, R.I. Anderson, H.C. Becker, D.E. Moorman, E.M. Vazey // *Alcohol Clin Exp Res.* — 2017. — Sep;41(9). — P. 1574-1583.
26. Sircar R. Ethanol alters N-methyl-D-aspartate receptor regulation in the hippocampus of adolescent rats // *Neuroreport.* — 2017. — Aug 2;28(11). — P. 625-629.
27. Tapia-Rojas C. Adolescent Binge Alcohol Exposure Affects the Brain Function Through Mitochondrial Impairment // F.J. Carvajal, R.G. Mira, C. Arc, J.M. Lerma-Cabrera, J.A. Orellana, W. Cerpa, R.A. Quintanilla // *Mol Neurobiol.* — 2017. — Jun 1.
28. Van Pett K. Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse / K. Van Pett, V. Viau, J.C. Bittencourt, R.K. Chan, H.Y. Li, C. Arias, G.S. Prins, M. Perrin, W. Vale, P.E. Sawchenko // *J Comp Neurol.* — 2000. — Dec 11;428(2). — P. 191-212.

DYNAMICS OF VARIATION OF mRNA AMOUNT OF CRF-R2 RECEPTOR IN HIPPOCAMPUS OF CHRONICALLY ALCOHOLIZED RATS UNDER ALCOHOL WITHDRAWAL

Airapetov M.I.^a, Eresko S.O.^b

*a — Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of Experimental Medicine»
Saint-Petersburg*

*b — Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Education
"Saint-Petersburg State University"
Saint-Petersburg*

Abstract. Chronic alcoholic intoxication is characterized by the decreasing control on the amount of alcohol intake as well as increasing tolerance towards it. It is known, that corticoliberine receptors of the second type (CRF-R2) are involved in the mechanism of chronic alcoholic intoxication. It was shown, that CRF-R2 are localized in hippocampus. In the course of our investigation we estimated the variation character of amount of mRNA CRF-R2 in hippocampus during abstinence syndrome. The obtained data show, that the amount of mRNA corticoliberine receptors of the second type in hippocampuses of chronically alcoholized rats during the alcohol withdrawal period has tendency for increasing at first and seventh days. Our results demonstrate dysregulation in neuromittors exchange in hippocampus area, which allows us to assume, the formation of cognitive impairment in the organism, which leads to the reduction of control on the amount of alcohol consumption.

Key words: corticoliberine receptors, mRNA, alcoholism, hippocampus.

References

1. Ajrapetov, M.I. Vlijanie hronicheskoj alkogolizacii i otmeny jetanola na uroven' jekspressii mRNK grelinovogo receptora v mozge krysa. / M.I. Ajrapetov, Je.A. Sekste, P.P. Hohlov i dr. // Narkologija. — 2013. — №9 (141). — S.61-65.
- 2a. Anohina I.P. Alkogolizm i jepigenetika / I.P. Anohina // Voprosy narkologii. — 2008. — №3. — S. 23-32.
- 2b. Anohina I.P. Rukovodstvo po narkologii / I.P. Anohina. — Moskva: Medpraktika, 2002. — S. 33-42.
3. Bogomolov D.V. Tanatologicheskaja ocenka morfologicheskikh izmenenij golovnogo mozga pri alkogol'noj bolezni / D.V. Bogomolov, A.L. Pavlov, G.G. Semenov, V.V. Jakovlev // Narkologija. — 2006. — № 11. — S. 45-47.
4. Bogomolova I.N. Porazhenie pecheni pri hronicheskoj narkoticheskoj intoksikacii / I.N. Bogomolova, D.V. Bogomolov, Ju.N. Pigolkin // Aktual'nye aspekty sudebno-medicinskoj jekspertizy. — Izhevsk: jekspertiza, 2000. — Vyp.6. — S. 85-88.
5. Burov Ju.V. Nejrohimiya i farmakologija alkogolizma / Ju.V. Burov, N.N. Vedernikova, N.A. Aliev — Moskva: Medicina, 1991. — 239 s.
6. Eresko S. O., Ajrapetov M. I. Disregulirujushhee toksicheskoe dejstvie jetanola na formirovanie grelinovoj sistemy u krysa // Molodoj uchenyj. — 2017. — №20. — S. 166-168.
7. Ivanec N.N. Smertnost' bol'nyh narkomanij v Rossijskoj Federacii. Analiz dannyh federal'nogo nabljudenija / N.N. Ivanec, E.A. Koshkina, V.V. Kirzhanova, V.M. Gurtovenko, N.I. Pavlovskaja, V.A. Hodyrev, V.A. Klevno, E.M. Solomatin, B.M. Lisjanskij // Voprosy narkologii. — 2008. — №3. — S. 105-118.
8. Saponov N.S. Gormony gipotalamo-gipofizarno-nadpochechnikovoj sistemy i mozg // SPb.: Jelbi-SPb, 2008. — 528s.
9. Shabanov P.D. Narkologija: prakticheskoe rukovodstvo dlja vrachej / P.D. Shabanov. — Moskva: GJeOTAR-MED, 2003. — 560 s.
10. Shabanov P.D. Podkrepljajushhie sistemy mozga: lokalizacija, nejrohimičeskaja organizacija, uchastie v formirovanii zavisimosti ot psihostimuljatorov / P.D. Shabanov, A.A. Lebedev // Psihofarmakol. i biol. narkol. — 2001. — T 1. — №1. — S. 13-27.
11. Shabanov P.D., Lebedev A.A., Rusanovskij V.V., Strel'cov V.F. Povedencheskie jeffekty kortikoliberina i ego analogov, vvodimyh v zheludochki mozga krysa // Med. Akad. Zhurn. — 2005. — T.5. — №3. — S. 4-9. 67
12. Shabanov P.D., Lebedev A.A., Strel'cov V.F. Gormonal'nye mehanizmy podkrepnenija // SPb.: Jelbi-SPb, 2008. — 272 s.
13. Becker H.C. Influence of stress associated with chronic alcohol exposure on drinking / H.C. Becker // Neuropharmacology. — 2017. — Aug 1. — P. 115-126.
14. Cantacorps L. Maternal alcohol binge drinking induces persistent neuroinflammation associated with myelin damage and behavioural dysfunctions in offspring mice / S. Alfonso-Loeches, M. Moscoso-Castro, J. Cuitavi, I. Gracia-Rubio, R. López-Arnau, E. Escubedo, C. Guerri, O. Valverde // Neuropharmacology. — 2017. — Sep 1 — P. 368-384.
15. Gounko N.V. Localization and functional roles of corticotropin-releasing factor receptor type 2 in the cerebellum / N.V. Gounko, A. Gramsbergen, J.J. Want // Cerebellum. — 2008. — V.7. — P. 4-8
16. Granholm L. The expression of opioid genes in non-classical reward areas depends on early life conditions and ethanol intake / L. Granholm, A. Todkar, S. Bergman, K. Nilsson, E. Comasco, I. Nylander // Brain Res. — 2017. — Aug 1. — P. 36-45.
17. Henricks A.M. Sex- and hormone-dependent alterations in alcohol withdrawal-induced anxiety and corticolimbic endocannabinoid signaling / A.M. Henricks, A.L. Berger, J.M.

- Lugo, L.N. Baxter-Potter, K.V. Bieniasz, G. Petrie, M.A. Sticht, M.N. Hill, R.J. McLaughlin // *Neuropharmacology*. — 2017. — Sep 1. — P. 121-133.
18. Kageyama K. Corticotropin-releasing factor receptor type 2 messenger ribonucleic acid in rat pituitary: localization and regulation by immune challenge, restraint stress, and glucocorticoids / K. Kageyama, C. Li, W.W. Vale // *Endocrinology*. — 2003. — Apr;144(4). — P. 1524-32.
 19. Klampfl S.M. Hypoactivation of CRF receptors, predominantly type 2, in the medial-posterior BNST is vital for adequate maternal behavior in lactating rats / S.M. Klampfl, P.J. Brunton, D.S. Bayerl, O.J. Bosch // *J Neurosci*. — 2014. — Jul 16;34(29). — P. 9665-76.
 20. Lê A.D. Role of κ -Opioid Receptors in the Bed Nucleus of Stria Terminalis in Reinstatement of Alcohol Seeking / A.D. Lê, D. Funk, K. Coen, S. Tamadon, Y. Shaham // *Neuropsychopharmacology*. — 2017. — Jun 7.
 21. Matsumoto I. Proteomics approach in the study of the pathophysiology of alcohol-related brain damage // *Alcohol Alcohol*. — 2009. — №44. — P. 171-176.
 22. Maynard M.E. Sex differences in hippocampal damage, cognitive impairment, and trophic factor expression in an animal model of an alcohol use disorder / M.E. Maynard, E.A. Barton, C.R. Robinson, J.I. Wooden, J.L. Leasure // *Brain Struct Funct*. — 2017. — Jul. 27.
 23. Pant R. Cognitive deficits induced by combined exposure of stress and alcohol mediated through oxidative stress-PARP pathway in the hippocampus / R. Pant, A. Jangra, M. Kwatra, T. Singh, P. Kushwah, B.K. Bezbaruah, S.S. Gurjar, S. Phukan // *Neurosci Lett*. — 2017. — Jul 13. — P. 653:208-214.
 24. Rajput P. Alcohol aggravates stress-induced cognitive deficits and hippocampal neurotoxicity: Protective effect of melatonin / P. Rajput, A. Jangra, M. Kwatra, A. Mishra, M. Lahkar // *Biomed Pharmacother*. — 2017. — Jul;91. — P. 457-466.
 25. Rodberg E.M. Stress Facilitates the Development of Cognitive Dysfunction After Chronic Ethanol Exposure / E.M. Rodberg, C.R. Hartog, R.I. Anderson, H.C. Becker, D.E. Moorman, E.M. Vazey // *Alcohol Clin Exp Res*. — 2017. — Sep;41(9). — P. 1574-1583.
 26. Sircar R. Ethanol alters N-methyl-D-aspartate receptor regulation in the hippocampus of adolescent rats // *Neuroreport*. — 2017. — Aug 2;28(11). — P. 625-629.
 27. Tapia-Rojas C. Adolescent Binge Alcohol Exposure Affects the Brain Function Through Mitochondrial Impairment // F.J. Carvajal, R.G. Mira, C. Arc, J.M. Lerma-Cabrera, J.A. Orellana, W. Cerpa, R.A. Quintanilla // *Mol Neurobiol*. — 2017. — Jun 1.
 28. Van Pett K. Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse / K. Van Pett, V. Viau, J.C. Bittencourt, R.K. Chan, H.Y. Li, C. Arias, G.S. Prins, M. Perrin, W. Vale, P.E. Sawchenko // *J Comp Neurol*. — 2000. — Dec 11;428(2). — P. 191-212.

УДК: 612.82 + 615.256.4 + 615.214

ВЛИЯНИЕ АГОНИСТА И АНТАГОНИСТА D₂-ТИПА ДОФАМИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ НА ОБУЧЕНИЕ ПРИ РАЗНОМ УРОВНЕ АНДРОГЕНОВ У КРЫС

Ю. О. Федотова^{а,б}

а — Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, Россия, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6, e-mail: julia.fedotova@mail.ru;

б — Университет ИТМО, Россия, 197101, Санкт-Петербург, Кронверский пр., 49.

Настоящая работа посвящена оценке степени вовлеченности D₂-типа рецепторов в условно-рефлекторное обучение у интактных, гонадэктомированных (ГЭ) и ГЭ самцов крыс, получавших тестостерона пропионат. Влияние хронического введения агониста D₂-типа дофаминовых рецепторов — квинпиrolа (0,1 мг/кг, внутривбрюшинно) и антагониста D₂-типа дофаминовых рецепторов — сульпирида (10,0 мг/кг, внутривбрюшинно), а также комбинации этих веществ с низкой дозой тестостерона пропионата (0,5 мг/кг, подкожно) в течение 14 дней на условно-рефлекторное обучение и поведение оценивалось в тестах условной реакции пассивного избегания (УРПИ) и «открытое поле», соответственно. Параллельно проводили определение уровня тестостерона в сыворотке крови с помощью тест-наборов *in vitro* методом иммуноферментного анализа. Установлено, что квинпиrol в комбинации с низкой дозой тестостерона пропионата полностью восстанавливает воспроизведение УРПИ у ГЭ крыс. При этом на фоне введения квинпиrolа в сочетании с тестостерона пропионатом у ГЭ самцов наблюдалось увеличение исследовательской активности и представленности груминга в тесте «открытое поле». Напротив, сульпирид, введенный изолированно или в комбинации с низкой дозой тестостерона пропионата, еще в большей степени нарушал воспроизведение УРПИ у ГЭ крыс. Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что хроническое введение квинпиrolа (стимуляция D₂-типа дофаминовых рецепторов) существенно улучшает воспроизведение УРПИ при дефиците андрогенов у самцов крыс. Комбинированное введение квинпиrolа и тестостерона пропионата полностью корректировало пассивное обучение у ГЭ самцов крыс. Гормональный анализ показал, что в условиях введения квинпиrolа одного или в сочетании с тестостероном пропионатом происходила коррекция уровня тестостерона в сыворотке крови у опытных ГЭ крыс по сравнению с контролем. В то же время, хроническое введение сульпирида (блокада D₂-типа дофаминовых рецепторов) выражено нарушало способность ГЭ самцов к формированию рефлекса пассивного избегания, а при его сочетанном введении с тестостерона пропионатом наблюдается блокирование позитивного эффекта гормонального препарата на пассивное обучение.

Ключевые слова: квинпиrol, сульпирид, D₂-тип дофаминовых рецепторов, обучение, поведение, андрогены, гонадэктомия.

Введение

Половые стероиды (андрогены и эстрогены) играют нейромодулирующую роль в механизмах обучения и памяти [4, 7, 8]. Рецепторы к андрогенам характеризуются высокой плотностью в структурах головного мозга, таких как гиппокамп, миндалина, гипоталамус и неокортекс, непосредственно участвующих в механизмах условно-рефлекторных процессов, а также в контроле различных форм эмоционального поведения [6, 11, 13].

Не вызывает сомнения существование тесного взаимодействия и взаимного влияния друг на друга гипофизарно-гонадной гормональной и дофаминергической нейромедиаторной систем. Наряду с этим, дофаминергическая система головного мозга также играет одну из ведущих ролей в механизмах высшей нервной деятельности [1, 5, 6]. Показано, что D₂-тип дофаминовых рецепторов имеют сходную с андрогеновыми рецепторами локализацию в структурах головного мозга [11, 14]. С другой стороны, хорошо известно, что снижение оптимального уровня андрогенов в мужском организме приводит к возникновению значительных изменений в психоэмоциональном и когнитивном статусе [7, 8]. При этом доказано, что уровень андрогенов в организме оказывает существенное влияние на параметры кругооборота дофамина в гиппокампе, гипоталамусе и миндалине, а также на характер экспрессии генов D₂-типа дофаминовых рецепторов в этих же структурах головного мозга [9, 10]. Вместе с тем, данные об эффектах андрогенов на дофаминергическую нейротрансмиссию в центральной нервной системе во многом противоречивы. Исходя из вышеизложенного, особый интерес представляет изучение эффектов взаимодействия между гипофизарно-гонадной и дофаминергической нейромедиаторной системами в механизмах условно-рефлекторной деятельности в условиях измененного уровня андрогенов в организме.

Целью настоящей работы было изучение роли D₂-типа дофаминовых рецепторов в избегательном поведении самцов крыс при дефиците андрогенов.

Материалы и методы

Работа выполнена на 140 белых самцах крыс линии Вистар в возрасте 3–4 месяцев, массой 180–200 г, полученных из питомника «Рапполово». Всех животных содержали в виварии в условиях 24-часового фоторежима, контролируемой температуры ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) и влажности ($65 \pm 10\%$) воздуха при свободном доступе к воде и стандартному корму (гранулированный комбикорм). Все исследования проводили в первой половине дня (10:00 — 13:00) с соблюдением правил гуманного обращения с лабораторными животными. При осуществлении данной работы выполнены общие требования «Правил лабораторной практики в Российской Федерации», утвержденными приказом Министерства Здравоохранения РФ № 708н от 23.08.2010 г. и Европейской конвенции Directive 2010/63/EU of 22 September 2010.

Все фармакологические препараты были получены из компании Сигма (США). В качестве агониста D₂-типа дофаминовых рецепторов использовали квинпирол (0,1 мг/кг, внутрибрюшинно), в качестве антагониста D₂-типа дофаминовых рецепторов — сульпирид (10,0 мг/кг, внутрибрюшинно). Дофаминергические вещества растворяли в физиологическом растворе и вводили в объеме 0,1 мл на крысу массой 200 г. Тестостерона пропионат растворяли в стерильном кунжутном масле и также вводили в объеме 0,1 мл на крысу массой 200 г. Выбор именно такой дозы тестостерона пропионата обусловлен тем, что экспериментальными исследованиями была установлена эффективность данной дозы тестостерона пропионата в адекватной коррекции эмоционального и гормонального статуса гонадэктомированных (ГЭ) самцов крыс. Контрольным крысам вводили эквивалентное количество растворителя. Введение фармакологических веществ осуществляли в течение 14 суток до начала поведенческих тестов.

Для выполнения поведенческих тестов крыс случайным образом разделяли на несколько групп по 10 особей в каждой: 1-я группа — контрольные интактные самцы, получавшие физиологический раствор (контроль), 2-я группа — интактные самцы, получавшие квинпирол, 3-я группа — интактные самцы, получавшие сульпирид, 4-я группа — контрольные ГЭ самцы, получавшие физиологический раствор, 5-я группа — ГЭ самцы, получавшие тестостерона пропионат, 6-я группа — ГЭ самцы, получавшие квинпирол, 7-я группа — ГЭ самцы, получавшие сульпирид, 8-я группа — ГЭ самцы, получавшие

квинпирол в комбинации с низкой дозой тестостерона пропионата, 9-я группа — ГЭ самцы, получавшие сульпирид в комбинации с низкой дозой тестостерона пропионата.

Гонадэктомия (удаление семенников) у крыс проводили согласно общепринятой методике [3]. Через 2 недели после операции выполняли все поведенческие тесты. Тестируемые животные были приучены к рукам экспериментатора до начала экспериментов. До начала непосредственного выполнения всех поведенческих тестов, все группы контрольных и экспериментальных крыс (каждая группа животных пребывала в своей домашней клетке) находились в соответствующей экспериментальной комнате со свето- и шумоизоляцией с поведенческими установками в течение 45 минут для устранения влияния стрессогенного фактора. Сохранение следа памяти оценивали по условному рефлексу пассивного избегания (УРПИ) с использованием стандартной методики [2]. Поведение животных оценивали в тесте «открытое поле» в течение 3 минут [13]. «Открытое поле» представляло собой квадратную площадку размером 78 см x 78 см и боковыми стенками высотой 36 см. Пол площадки был разделен на 16 равных квадратов размером 19,5 см x 19,5 см. Площадка равномерно освещалась источником света мощностью 100 Вт. Контроль изменений в поведении животного осуществлялся автоматически с помощью программно-аппаратного комплекса «Биологическая установка «открытое поле» (Государственный Электро-технический университет им. Д. И. Ульянова, Санкт-Петербург). Регистрировали следующие параметры: двигательную горизонтальную активность («перемещение») и двигательную вертикальную активность («вставание»); исследовательскую активность (исследование крысой круглых сквозных отверстий, расположенных на полу); груминговые реакции (вычесывание, вылизывание, умывание и др.); эмоциональные реакции (дефекация и уринация).

После окончания выполнения поведенческих тестов методом декапитации крыс производили взятие крови на иммуноферментный анализ уровня тестостерона в организме контрольных и опытных групп животных. Для иммуноферментного анализа кровь всех животных забирали в сухие стерильные пробирки и центрифугировали при 3000 об/мин. Сыворотку отбирали для дальнейшего исследования на иммуноферментном анализаторе «Униплан» (Пикон, Россия) с помощью тест-набора для определения концентрации тестостерона *in vitro* фирмы DRG (Германия) с предварительной раститровкой и подбором соответствующей аликвоты с использованием проверочных тестов на удвоение и процента внутреннего открытия.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием дисперсионного анализа two-way ANOVA test с последующим Newman-Keuls post-hoc тестом с помощью пакета программ Statistica for Windows 9.0. Различия между значениями при $P < 0,05$ считали статистически значимыми.

Результаты исследования

На модели УРПИ было установлено, что гонадэктомия вызывает нарушение процесса воспроизведения УРПИ через 24 часа после предварительного обучения по сравнению с группой контрольных самцов ($p < 0,05$, рис. 1). Хроническое введение низкой дозы тестостерона пропионата ГЭ самцам в некоторой степени улучшало процесс воспроизведения УРПИ по сравнению с контрольными ГЭ самцами ($p < 0,05$, рис. 1).

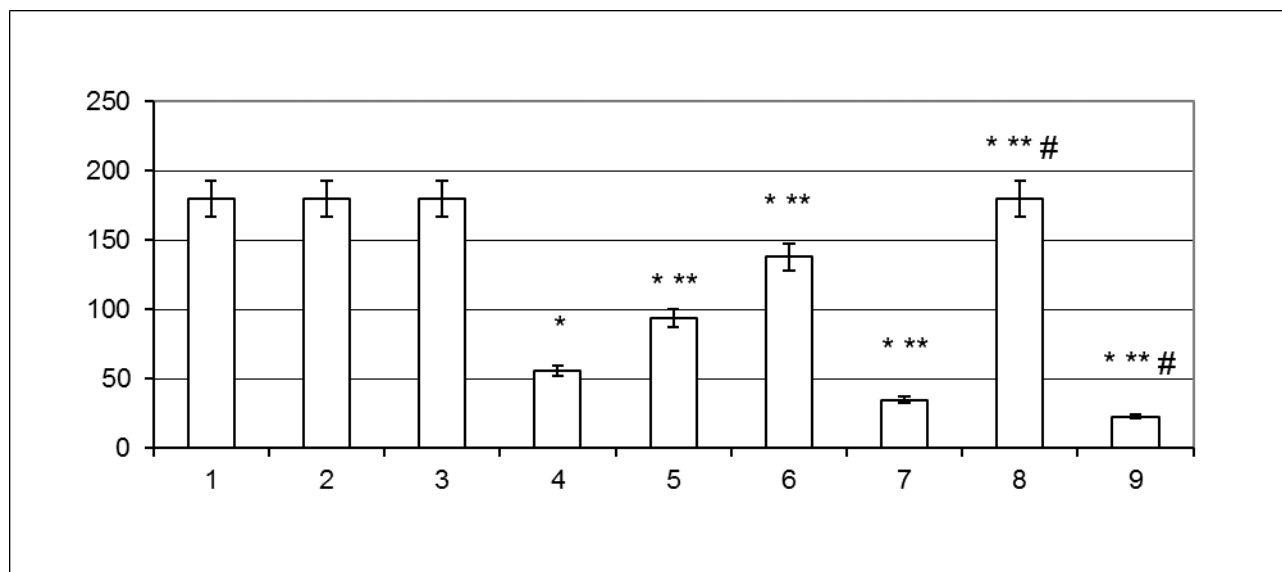


Рис.1. — Влияние квинпирила и сульпирида, введенных изолированно или в комбинации с низкой дозой тестостерона пропионата, на воспроизведение УРПИ гонадэктомированных самцов крыс. Ось X — группы животных, Ось Y — латентный период, сек. Группы животных: 1-я группа — контрольные интактные самцы, получавшие физиологический раствор (контроль), 2-я группа — интактные самцы, получавшие квинпирил, 3-я группа — интактные самцы, получавшие сульпирид, 4-я группа — контрольные ГЭ самцы, получавшие физиологический раствор, 5-я группа — ГЭ самцы, получавшие тестостерона пропионат, 6-я группа — ГЭ самцы, получавшие квинпирил, 7-я группа — ГЭ самцы, получавшие сульпирид, 8-я группа — ГЭ самцы, получавшие квинпирил в комбинации с низкой дозой тестостерона пропионата, 9-я группа — ГЭ самцы, получавшие сульпирид в комбинации с низкой дозой тестостерона пропионата. Примечание: * — $p < 0,05$, достоверное отличие от контрольных интактных самцов, ** — $p < 0,05$, достоверное отличие от ГЭ самцов, # — $p < 0,05$, достоверное отличие от ГЭ самцов, получавших низкую дозу тестостерона пропионата. Данные представлены в виде $M \pm m$, количество животных в группах — $N=10$.

Хроническое введение агониста и антагониста D_2 -типа дофаминовых рецепторов — квинпирила или сульпирида не изменяло показатели воспроизведения УРПИ по сравнению с группой контрольных интактных самцов ($p > 0,05$, рис. 1). Хроническое введение квинпирила у ГЭ самцов значительно улучшало способность животных к воспроизведению УРПИ, что выражалось в достоверном увеличении латентного периода незахождения животного в темную камеру через 24 часа после обучения ($p < 0,05$, рис. 1). При этом на фоне применения квинпирила в комбинации с низкой дозой тестостерона пропионата проявлялось кумулятивное позитивное действие обоих веществ на процесс пассивного обучения, т.е. наблюдалось полное восстановление процесса воспроизведения УРПИ до показателей, регистрируемых в группе контрольных интактных самцов. С другой стороны на фоне введения сульпирида у ГЭ самцов происходило выраженное ухудшение процесса воспроизведения УРПИ по сравнению с ГЭ самцами, получавшими растворитель и контрольными крысами, что выражалось в достоверном снижении латентного периода незахождения животного в темную камеру через 24 часа после обучения ($p < 0,05$, рис. 1). Кроме того, необходимо отметить, что при введении сульпирида в сочетании с низкой дозой тестостерона пропионата происходило блокирование позитивного эффекта гормонального препарата на воспроизведение УРПИ у ГЭ самцов.

В тесте «открытое поле» было выявлено, что хроническое введение сульпирида интактным самцам достоверно снижало горизонтальную двигательную активность,

исследовательскую активность и представленность груминга, а также полностью угнетало эмоциональную реактивность по сравнению с контрольной группой крыс ($p < 0,05$, табл. 1).

Таблица 1

Влияние квинпирила и сульпирида, введенных изолированно или в комбинации с низкой дозой тестостерона пропионата, на поведение гонадэктомированных самцов крыс в тесте «открытое поле»

Группы животных	Двигательная активность		Исследовательская активность	1. Эмоциональность	
	Перемещение	Вставание		Норка	Груминг
Интактные самцы (контроль)	62,1 ± 3,6	10,8 ± 1,2	3,0 ± 0,6	2,2 ± 0,2	1,0 ± 0,2
Интактные самцы + квинпирил	24,3 ± 1,8*	7,8 ± 1,2	2,0 ± 0,5	0,7 ± 0,2*	0
Интактные самцы + сульпирид	34,4 ± 1,2*	9,9 ± 1,4	1,2 ± 0,2*	0,6 ± 0,2*	0
ГЭ самцы	53,4 ± 2,4	12,2 ± 2,0	4,4 ± 0,2	2,6 ± 0,2	1,0 ± 0,2
ГЭ самцы + тестостерона пропионат	70,1 ± 5,6	11,9 ± 2,2	3,2 ± 0,2	2,2 ± 0,2	1,2 ± 0,2
ГЭ самцы + квинпирил	55,9 ± 2,6	13,2 ± 1,4	2,8 ± 0,2	2,8 ± 0,2	1,0 ± 0,2
ГЭ самцы + сульпирид	76,8 ± 4,2**	12,6 ± 2,0	6,8 ± 0,2* **	5,3 ± 0,2* **	1,2 ± 0,2
ГЭ самцы + квинпирил + тестостерона пропионат	59,4 ± 2,8	11,3 ± 2,0	3,7 ± 0,2	2,6 ± 0,2	1,0 ± 0,2
ГЭ самцы + сульпирид + тестостерона пропионат	71,3 ± 3,8**	13,7 ± 1,2	6,1 ± 0,2* ** #	6,6 ± 0,2* ** #	0,8 ± 0,2

Примечание: * — $p < 0,05$, достоверное отличие от контрольных интактных самцов, ** — $p < 0,05$, достоверное отличие от ГЭ самцов, # — $p < 0,05$, достоверное отличие от ГЭ самцов, получавших низкую дозу тестостерона пропионата. Данные представлены в виде $M \pm m$, количество животных в группах – $N=10$.

На фоне введения квинпирила у интактных самцов отмечалось сходное уменьшение показателя горизонтальной двигательной активности, как и в случае использования сульпирида, при параллельном выраженном снижении представленности груминга и угнетении эмоционального компонента поведения по сравнению с контрольной группой крыс ($p < 0,05$, табл. 1). Хроническое введение квинпирила изолированно или совместно с низкой дозой тестостерона пропионата не меняло общий характер поведения ГЭ самцов по сравнению с контрольными интактными и ГЭ самцами ($p < 0,05$, табл. 1). В условиях введения сульпирида одного или в комбинации с низкой дозой тестостерона пропионата отмечалось увеличение представленности груминга и исследовательской активности по сравнению

с контрольными группами интактных и ГЭ крыс, а также с группой ГЭ самцов, получавших только тестостерона пропионат ($p < 0,05$, табл. 1).

Гормональный анализ выявил, что гонадэктомия приводит к снижению уровня тестостерона в сыворотке крови, тогда как экзогенное введение тестостерона пропионата ГЭ крысам в некоторой степени корректирует его содержание по сравнению ГЭ животными, не получавшими гормонального вещества ($p < 0,05$, табл. 2). Хроническое введение агониста или антагониста D_2 -типа дофаминовых рецепторов интактным крысам не меняло показатели уровня тестостерона по сравнению с группой контрольных самцов ($p > 0,05$, табл. 2). Изолированное введение квинпиrolа ГЭ самцам достоверно повышало уровень тестостерона в сыворотке крови по сравнению ГЭ крысами, получавшими физиологический раствор ($p < 0,05$, табл. 2). При комбинированном введении квинпиrolа в комбинации тестостерона пропионатом наблюдалось более выраженное повышение уровня тестостерона у ГЭ самцов по сравнению с ГЭ самцами, получавшими тестостерона пропионат или физиологический раствор ($p < 0,05$, табл. 2).

Таблица 2

Влияние квинпиrolа и сульпирида, введенных изолированно или в комбинации с низкой дозой тестостерона пропионата, на уровень тестостерона в сыворотке крови гонадэктомированных самцов крыс

Группы животных	Концентрация тестостерона, нмоль/л
Интактные самцы (контроль)	$4,2 \pm 0,2$
Интактные самцы + квинпиrol	$3,7 \pm 0,5$
Интактные самцы + сульпирид	$4,6 \pm 0,4$
ГЭ самцы	$1,2 \pm 0,3^*$
ГЭ самцы + тестостерона пропионат	$2,9 \pm 0,2^* **$
ГЭ самцы + квинпиrol	$3,8 \pm 0,2^{**}$
ГЭ самцы + сульпирид	$5,1 \pm 0,6^{**} \#$
ГЭ самцы + квинпиrol + тестостерона пропионат	$0,9 \pm 0,2^* **$
ГЭ самцы + сульпирид + тестостерона пропионат	$1,4 \pm 0,5^* ** \#$

Примечание: * — $p < 0,05$, достоверное отличие от контрольных интактных самцов, ** — $p < 0,05$, достоверное отличие от ГЭ самцов, # — $p < 0,05$, достоверное отличие от ГЭ самцов, получавших низкую дозу тестостерона пропионата. Данные представлены в виде $M \pm m$, количество животных в группах – $N=10$.

Напротив, на фоне введения сульпирида одного или в комбинации с гормональным препаратом у ГЭ самцов не было отмечено изменений в содержании тестостерона в сыворотке крови по сравнению с ГЭ самцами, получавшими тестостерона пропионат или физиологический раствор ($p > 0,05$, табл. 2). Такие данные указывают на способность сульпирида препятствовать какому-либо изменению концентрации тестостерона в организме даже в условиях его применения с экзогенно введенным тестостерона пропионатом.

Обсуждение результатов исследования

Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что на поведенческие ответы агониста и антагониста D_2 -типа дофаминовых рецепторов влияют гормональные сдвиги, происходящие у самцов как после гонадэктомии, так и после экзогенного введения тестостерона пропионата. Этот факт указывает на то, что уровень андрогенов в организме

может модулировать поведенческие ответы в условиях блокады разных типов дофаминовых рецепторов головного мозга. Кроме того, результаты настоящего исследования также позволяют говорить о разнонаправленном характере влияния стимуляции и блокады D₂-типа дофаминовых рецепторов на динамику пассивного обучения на фоне дефицита андрогенов, а также доказывают, что препараты, влияющие на дофаминергическую нейротрансмиссию, могут также модулировать поведенческие процессы у самцов с разным гормональным статусом. Таким образом, можно говорить о взаимном модулирующем влиянии гипофизарно-гонадной и дофаминергической систем друг на друга при дисбалансе андрогенов в организме.

Модель УРПИ показала, что у ГЭ самцов воспроизведение этого рефлекса не происходит, тогда при введении низкой дозы тестостерона пропионата отмечается частичное улучшение формирования УРПИ. При этом, позитивный эффект экзогенного введения тестостерона пропионата на воспроизведение УРПИ не сопровождается изменениями характера поведенческих реакций в тесте «открытое поле». Полученные результаты согласуются с целым рядом данных литературы о снижении способности к выработке условных рефлексов на различных моделях обучения у самцов крыс с низким уровнем андрогенов в организме, а также с тем, что повышение уровня тестостерона в организме у самцов облегчает процесс консолидации и воспроизведение следа из долговременной памяти [14, 15].

Как показывает анализ данных, полученных с использованием фармакологического подхода на модели УРПИ, хроническое введение агониста и антагониста D₂-типа дофаминовых рецепторов интактным самцам не меняло показатели воспроизведения УРПИ. Полученные данные свидетельствуют о том, что активация или блокада центральных D₂-типа дофаминовых рецепторов не влияет на процессы формирования и воспроизведения рефлекса пассивного избегания в условиях естественного и адекватного уровня андрогенов у самцов крыс.

Совершенно иная картина наблюдалась при блокаде D₂-типа дофаминовых рецепторов в условиях дефицита андрогенов или экзогенного введения тестостерона пропионата. Так, хроническое введение антагониста D₂-типа дофаминовых рецепторов — сульпирида еще в большей степени нарушало процесс пассивного избегания у ГЭ самцов. Наряду с этим, при сочетанном применении данного вещества с низкой дозой тестостерона пропионата, отмечалось блокирование позитивного эффекта гормонального препарата на способность ГЭ крыс к выработке и сохранению УРПИ. В противоположность этому, хроническое введение агониста D₂-типа дофаминовых рецепторов — квинпирила существенно улучшало воспроизведение рефлекса пассивного избегания, а при его комбинированном введении с тестостерона пропионатом в низкой дозе регистрировалась полная коррекция процесса воспроизведения УРПИ. По-видимому, можно говорить о суммации позитивных эффектов квинпирила и тестостерона пропионата на воспроизведение следа памяти у ГЭ самцов. Выявленные изменения в поведенческих реакциях в тесте «открытое поле» у ГЭ самцов, получавших квинпирил в комбинации с тестостероном пропионатом, соответствуют наблюдаемому улучшению процесса воспроизведения УРПИ. Данные, полученные в тесте УРПИ у ГЭ самцов при комбинированном введении квинпирила и тестостерона пропионата, позволяют говорить о триггерной роли низкой дозы тестостерона в коррекции процесса воспроизведения УРПИ. Кроме того, сочетанное введение агониста D₂-типа дофаминовых рецепторов и тестостерона пропионата в низкой дозе приводит к полной нормализации нарушенного процесса пассивного обучения, в отличие от их изолированного введения.

Интересно отметить, что в наших предыдущих исследованиях, посвященных изучению эффектов дофаминергических веществ у овариоэктомированных (ОЭ) самок крыс, были выявлены однотипные закономерности в эффектах агониста и антагониста D₂-типа дофаминовых рецепторов на фоне их изолированного или комбинированного введения с низкой дозой 17β-эстрадиола, что не было обнаружено нами в эффектах этих же веществ на

пассивное обучение у ГЭ самцов [4]. Так, квинпирил, как и сульпирид, введенные изолированно или в комбинации с низкой дозой 17β -эстрадиола корректировали процесс воспроизведения УРПИ у ОЭ крыс [4]. Сравнительный анализ эффектов агониста и антагониста D_2 -типа дофаминовых рецепторов на модели УРПИ у ОЭ самок и ГЭ самцов позволяет сделать заключение о том, что поведенческие эффекты дофаминотропных веществ четко детерминируются гендерной принадлежностью и уровнем половых гормонов в организме. Таким образом, полученные данные настоящего исследования свидетельствуют о том, что блокада центральных D_2 -типа дофаминовых рецепторов существенно нарушает процесс формирования и сохранения навыка пассивного избегания, тогда как стимуляция D_2 -типа рецепторов, напротив, способствует улучшению процессу пассивного обучения при дисбалансе андрогенов. Данные результаты четко свидетельствуют о том, что центральные D_2 -типа дофаминовые рецепторы играют роль в пассивном избегании и это является гормон-зависимым процессом при колебаниях уровня андрогенов в организме самцов крыс.

В то же время, в наших экспериментальных условиях можно говорить об отсутствии какой-либо корреляции между эффектами агониста и антагониста D_2 -типа дофаминовых рецепторов на пассивное избегание и поведенческими изменениями, выявленными в тесте «открытое поле» у интактных и ГЭ самцов. Хроническое введение агониста и антагониста D_2 -типа дофаминовых рецепторов интактным самцам не влияло на динамику воспроизведения УРПИ, несмотря на то, что их применение вызывало изменения исследовательского и грумингового компонентов поведения, а также параметров эмоционального статуса крыс в тесте «открытое поле». Хотя хроническое введение квинпирила как одного, так и в комбинации с тестостерона пропионатом и не приводило к достоверным изменениям в структуре поведения ГЭ самцов в тесте «открытое поле», однако было зарегистрировано полное восстановление процесса воспроизведения УРПИ. В то же время, введение сульпирида изолированно или в комбинации с тестостерона пропионатом повышало исследовательский и груминговый компоненты поведения, тем не менее воспроизведения УРПИ у этих групп крыс не наблюдалось. Таким образом, поведенческие эффекты комбинированного или изолированного введения дофаминергических веществ и тестостерона пропионата на воспроизведение УРПИ у ГЭ самцов не могут быть объяснены лишь изменениями поведенческих реакций, которые выявлены в тесте «открытое поле».

Результаты иммуноферментного анализа у ГЭ крыс, на фоне хронического введения агониста или антагониста D_2 -типа дофаминовых рецепторов изолированно или в сочетании с тестостерона пропионатом, свидетельствуют о существовании взаимосвязи между изменениями, обнаруженными на модели УРПИ и уровнем тестостерона в организме опытных групп животных. Так, повышение уровня тестостерона в сыворотке крови ГЭ крыс, получавших квинпирил или квинпирил в комбинации с тестостерона пропионатом сопровождалось восстановлением воспроизведения рефлекса пассивного избегания у этих групп животных. С другой стороны, ухудшение процесса формирования и воспроизведения УРПИ у ГЭ крыс, получавших сульпирид или комбинацию сульпирида с тестостерона пропионатом, соответствовало отсутствию изменений в уровне тестостерона в организме, особенно в условиях экзогенно введенного гормонального вещества. Таким образом, можно говорить о том, что характер условно-рефлекторной деятельности у ГЭ крыс на фоне применения агониста или антагониста D_2 -типа дофаминовых рецепторов изолированно или в сочетании с тестостерона пропионатом может быть обусловлен изменениями в уровне тестостерона в организме у опытных групп крыс.

Принято считать, что дофаминергическая система является триггерным звеном в механизмах формирования различных форм избегательного поведения животного [8, 15]. Наряду с этим, не вызывает сомнения, что между половыми гормонами и дофаминергической системой существует тесная взаимосвязь. В свою очередь, дофаминергическая система, как полагают, участвует в реализации негативного обратного действия андрогенов [5, 14]. Однако очень трудно сделать какое-либо однозначное

заклучение о характере взаимодействий между андрогенами и дофаминергической системой головного мозга. Выявлены изменения в биосинтезе дофамина, высвобождении, обратном захвате и метаболизме у ГЭ самцов [10–12]. Установлено, что гонадэктомия у самцов сопровождается выраженным снижением плотности дофаминовых рецепторов типа без изменения их чувствительности, при этом заместительная терапия тестостерона пропионатом увеличивает или даже восстанавливает плотность дофаминовых рецепторов [9, 14]. Противоположно направленные эффекты квинпирила и сульпирида у ГЭ самцов могут быть связаны с тем, что эти вещества воздействуют не только на D₂-дофаминовые рецепторы, но и на D₃-дофаминовые рецепторы, расположенные в структурах головного мозга, участвующих в механизмах аффективного поведения. Показано, что воздействие, например, сульпирида в малых дозах на пресинаптические D₃-дофаминовые рецепторы, их избирательная блокада усиливают выброс дофамина [1, 11]. Кроме того, противоположно направленные эффекты квинпирила и сульпирида на условно-рефлекторную деятельность ГЭ самцов могут быть связаны с измененным обменом дофамина и его метаболитов, количеством и связывающей способности D₂-/D₃-дофаминовых и андрогеновых рецепторов, а также с измененным характером экспрессии генов этих рецепторов в структурах гиппокампа и лимбической системы мозга. Кроме того, нельзя не учитывать важную роль гиппокампального МАРК-сигналинга в регуляции психоэмоциональных реакций у самцов крыс, который, как полагают, лежит в патогенезе многих нервно-психических расстройств при дисбалансе андрогенов [11, 13]. Необходимо отметить, что в доступной нам литературе не было обнаружено сходных исследований и все полученные данные носят приоритетный характер. В связи с этим, выяснение молекулярно-биохимических механизмов эффектов дофаминергических веществ, воздействующих на D₂-тип дофаминовых рецепторов в условиях дефицита андрогенов будет являться предметом наших дальнейших исследований.

Выводы

Таким образом, результаты настоящего исследования свидетельствуют о существенной роли D₂-типа дофаминовых рецепторов в условно-рефлекторной деятельности у самцов крыс в условиях дефицита андрогенов. Данное исследование доказывает вовлеченность D₂-типа дофаминовых рецепторов в процессы обучения и памяти при дисбалансе андрогенов в организме. Результаты исследования указывают на необходимость дальнейшего изучения эффектов фармакологических веществ, действующих на D₂-тип дофаминовых рецепторов, в качестве возможных средств для коррекции нарушений высших функций мозга при дефиците андрогенов в организме.

Литература

1. Баришполец В. В., Федотова Ю. О., Сапронов Н. С. Структурно-функциональная организация дофаминергической системы головного мозга // Эксперим. и клинич. фармакол. — 2009 — Т. 72 — № 3 — С. 44–49.
2. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Дж. П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Я. Буреш, О. Бурешова, Дж. П. Хьюстон — Москва: «Высшая школа», 1991 — 399 с.
3. Киршенблат Я. Д. Практикум по эндокринологии / Я. Д. Киршенблат Москва: Высшая школа, 1969 — 255 с.
4. Сапронов Н. С., Федотова Ю. О. Гормоны гипоталамо-гипофизарно-овариальной системы и мозг / Н.С. Сапронов, Ю.О. Федотова — СПб.: Формиздат., 2009 — 459 с.
5. Beaulieu J. M., Gainetdinov R. R. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors // Pharmacol. Rev. — 2011. — Vol. 63. — № 1. — P. 182–217.
6. Bhasin S., Basaria S. Diagnosis and treatment of hypogonadism in men // Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. — 2011. — Vol. 25 — № 2 — P. 251–270.

7. Gibbs R. B., Johnson D. A. Sex-specific effects of gonadectomy and hormone treatment on acquisition of a 12-arm radial maze task by Sprague Dawley rats // *Endocrinol.* — 2008 — Vol.149 — № 6 — P. 3176–3183.
8. Jay T. M. Dopamine: a potential substrate for synapse plasticity and memory mechanisms // *Progr. Neurobiol.* — 2003 — Vol. 69 — 375–390.
9. McHenry J., Carrier N., Hull E., Kabbaj M. Sex differences in anxiety and depression: role of testosterone // *Front. Neuroendocrinol.* — 2014 — Vol. 35 — P. 42–57.
10. Nasehi M., Piri M., Nouri M., Farzin D., et al. Involvement of dopamine D₁/D₂ receptors on harmaline-induced amnesia in the step-down passive avoidance test // *Eur. J. Pharmacol.* — 2010 — Vol. 634 — P. 77–83.
11. Perez de la Mora M., Gallegos-Cari A., Arizmendi-Garc Y., et al. Role of dopamine receptor mechanisms in the amygdaloid modulation of fear and anxiety: Structural and functional analysis // *Progr. Neurobiol.* — 2010 — Vol. 90 — P. 198–216.
12. Pike C. J., Nguyen T. V., Ramsden M. Androgen cell signaling pathways involved in neuroprotective actions // *Horm. Behav.* — 2008 — Vol. 53 — № 5 — P. 693–705.
13. Prut L., Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review // *Eur. J. Pharm.* — 2003 — Vol. 463 — № 1 — P. 3–33.
14. Souza de Silva M. A., Mattern C., Topic B., et al. Dopaminergic and serotonergic activity in neostriatum and nucleus accumbens enhanced by intranasal administration of testosterone // *Eur. Neuropsychopharmacol.* — 2009 — Vol. 19 — P. 53–63.
15. Spritzer M. D., Daviau E. D., Coneeny M. K., et al. Effects of testosterone on spatial learning and memory in adult male rats // *Horm. Behav.* — 2011 — Vol. 59 — № 4 — P. 484–496.

INFLUENCE OF AGONIST AND ANTAGONIST FOR D₂-TYPE DOPAMINERGIC RECEPTORS ON AVOIDANCE PERFORMANCE IN RATS WITH DIFFERENT ANDROGENS LEVELS

Fedotova Y.O. ^{a,b}

^a *I.P. Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 199034, Makarova Emb., 6, Russia, e-mail: julia.fedotova@mail.ru;*

^b *ITMO University, St. Petersburg, 197101, Kronversky Pr., 49, Russia.*

Abstract. This research work represents a comparative analysis for agonist and antagonist of D₂-types dopaminergic receptors effects on passive avoidance performance in intact, gonadectomized (GDX) and GDX male rats administered by testosterone propionate. The effects for chronic administration of agonist of D₂-type dopaminergic receptors — quinperole (0,1 mg/kg, i.p.) and antagonist of D₂-type dopaminergic receptors — sulpiride (10,0 mg/kg, i.p.), as well as its combination with a low dose of testosterone propionate (0,5 mg/kg, s.c.) were tested during 14 days on behavioral processes in the passive avoidance paradigm and the «open field» test. Simultaneously, we measured testosterone levels in the blood serum using test-system *in vitro* by immune-enzyme assay. Co-administration of quinperole with a low dose of testosterone propionate completely restored impaired passive avoidance performance in GDX males. Moreover, GDX rats were treated with quinperole plus a low dose of testosterone propionate and demonstrated increased exploratory and grooming behavior in the «open field» test. Both sulpiride alone and in combination with low dose of testosterone propionate markedly impaired passive avoidance learning in GDX rats. The results of the present study suggest that chronic administration of quinperole (stimulation of D₂-type dopaminergic receptors) markedly improves passive avoidance performance in GDX rats. Moreover, co-treatment with quinperole and testosterone propionate completely corrects passive avoidance learning in GDX male rats. Hormonal assay showed that

chronic administration of quinperole alone or in a combination with testosterone propionate corrected testosterone levels in the blood serum in GDX rats as compared to the control rats. However, chronic treatment with sulpiride (blockade of D₂-type dopaminergic receptors) significantly impairs capability of GDX rats to formation of passive avoidance performance. Moreover, its combination with testosterone propionate resulted in blockade of positive effect for testosterone propionate on passive avoidance performance.

Keywords: quinperole, sulpiride, D₂-type dopaminergic receptors, avoidance learning, behavior, androgens, gonadectomy.

References

1. Barishpolets V.V., Fedotova Iu.O., Saponov N.S. Structural and functional organization of the cerebral dopaminergic system // *Eksp. Klin. Farmakol.* – 2009 – Vol. 72 – № 3 – P. 44-49.
2. Bures J., Buresova O., Houston J.P. Techniques and basic experiments for study of brain and behavior / J. Bures, O. Buresova, J.P. Houston – Moscow: Higher school, 1991 – 399 pp.
3. Kirshenblat J.D. Workshop on endocrinology / J.D. Kirshenblat – M.: Higher school, 1969 – 255 pp.
4. Saponov N.S., Fedotova Yu.O. Hormones of the hypothalamic-pituitary-ovarian system and the brain / N.S. Saponov, Yu.O. Fedotova – St. Petersburg: Formistin, 2009. – 459 pp.
5. Beaulieu J. M., Gainetdinov R. R. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors // *Pharmacol. Rev.* – 2011. – Vol. 63. – № 1. –P. 182-217.
6. Bhasin S., Basaria S. Diagnosis and treatment of hypogonadism in men // *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2011. – Vol. 25 – № 2 – P. 251-270.
7. Gibbs R. B., Johnson D. A. Sex-specific effects of gonadectomy and hormone treatment on acquisition of a 12-arm radial maze task by Sprague Dawley rats // *Endocrinol.* – 2008 – Vol.149 – № 6 – P. 3176-3183.
8. Jay T. M. Dopamine: a potential substrate for synapse plasticity and memory mechanisms // *Progr. Neurobiol.* – 2003 – Vol. 69 – 375-390.
9. McHenry J., Carrier N., Hull E., Kabbaj M. Sex differences in anxiety and depression: role of testosterone // *Front. Neuroendocrinol.* – 2014 – Vol. 35 – P. 42-57.
10. Nasehi M., Piri M., Nouri M., Farzin D., et al. Involvement of dopamine D₁/D₂ receptors on harmaline-induced amnesia in the step-down passive avoidance test // *Eur. J. Pharmacol.* – 2010 – Vol. 634 – P. 77-83.
11. Perez de la Mora M., Gallegos-Cari A., Arizmendi-Garc Y., et al. Role of dopamine receptor mechanisms in the amygdaloid modulation of fear and anxiety: Structural and functional analysis // *Progr. Neurobiol.* – 2010 – Vol. 90 – P. 198-216.
12. Pike C. J., Nguyen T. V., Ramsden M. Androgen cell signaling pathways involved in neuroprotective actions // *Horm. Behav.* – 2008 – Vol. 53 – № 5 – P. 693-705.
13. Prut L., Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review // *Eur. J. Pharm.* – 2003 – Vol. 463 – № 1 –P. 3-33.
14. Souza de Silva M. A., Mattern C., Topic B., et al. Dopaminergic and serotonergic activity in neostriatum and nucleus accumbens enhanced by intranasal administration of testosterone // *Eur. Neuropsychopharmacol.* – 2009 – Vol. 19 – P. 53-63.
15. Spritzer M. D., Daviau E. D., Coneeny M. K., et al. Effects of testosterone on spatial learning and memory in adult male rats // *Horm. Behav.* – 2011 – Vol. 59 – № 4 – P. 484-496.

СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ НАУКИ / AGRICULTURAL SCIENCE

УДК: 635.8

**ВЛИЯНИЕ ВИДА СУБСТРАТА И ВРЕМЕНИ ЕГО ПОДГОТОВКИ
НА СТЕПЕНЬ РАЗМНОЖЕНИЯ МИЦЕЛИЯ ВЁШЕНКИ ОБЫКНОВЕННОЙ
(*PLEUROTUS OSTREATUS*)**

М. В. Серёгин

*Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Пермская государственная сельскохозяйственная академия
имени академика Д.Н. Прянишникова»
г. Пермь*

В статье приведено изучение влияния различных видов субстратов на основе зерна злаковых культур и времени его подготовки на степень размножения мицелия вёшенки обыкновенной. Исследования были проведены в условиях школьной лаборатории МБОУ СОШ «Шерьинская — Базовая школа» Нытвенского района Пермского края. Выявлено, что лучшим субстратом для размножения мицелия вёшенки обыкновенной является овес. На данном субстрате была получена наибольшая степень размножения мицелия вёшенки обыкновенной — 70 %, благодаря его большей пленчатости. Лучшее время для подготовки субстратов — это проваривание (обеззараживание) субстрата в течение 30 минут.

Ключевые слова: вёшенка обыкновенная, вид субстрата, зерно, мицелий, степень размножения мицелия.

Введение

Вёшенка обыкновенная (лат. *Pleurotus ostreatus*) — съедобный гриб рода вёшенок семейства вёшенковых, который культивируется в промышленных масштабах во многих странах мира, включая Россию. В отличие от многих других грибов, вёшенки в искусственных условиях растут практически на любом субстрате, содержащем целлюлозу и лигнин, а именно: на отходах деревопереработки (опилках, стружке, коре, бумаге), на отходах сельскохозяйственного производства (солومه злаковых культур, початках и стеблях кукурузы, отходах сахарного тростника, камыше, лузге подсолнечника) и т. п. [1]. В последнее время выращивание плодовых тел вёшенки получило большую популярность в любительской среде. Технология выращивания грибов подробно описана в интернете, но после получения урожая грибов остро встает вопрос о дальнейшем использовании грибницы, то есть её размножении. Покупка нового мицелия для получения следующего урожая грибов достаточно затратна. Грибоводы «профессионалы» на своих интернет страницах предлагают много способов размножения мицелия, и в этой информации довольно трудно разобраться, так как многие интернет-ресурсы противоречивы [2]. Целью данных исследований является разработка приемов технологии размножения мицелия вёшенки обыкновенной в непромышленных условиях. Для достижения этой цели были определены следующие задачи: определить влияние вида субстрата на степень размножения мицелия вёшенки, установить оптимальное время подготовки субстрата.

Материалы и методы

Для исследования применяли двухфакторный опыт, который был заложен в 2016 году в школьной лаборатории МБОУ СОШ «Шерьинская — Базовая школа» Нытвенского района Пермского края.

Схема опыта: фактор А — вид субстрата: А₁ — зерно пшеницы; А₂ — зерно ячменя; А₃ — зерно овса; фактор В — время подготовки субстрата: В₁ — 15 минут; В₂ — 30 минут. Размножение мицелия гриба вёшенки проводили от плодоносившего грибного мешка. Время проведения исследований 14 дней при постоянной комнатной температуре 20 °С. Опыт проводили в четырёх повторностях, в соответствии с общепринятой методикой при проведении научных исследований с помощью метода расщепления изучаемых вариантов по Методике В. Ф. Моисейченко [3]. В период исследования проводили фенологические наблюдения за скоростью роста мицелия вёшенки на изучаемых субстратах, по методике И. А. Дудка [4]. Степень зарастания зерна мицелием оценивали по 5-балльной шкале на 14-е сутки после посева: до 20% объёма субстрата — 1 балл; от 20% до 40% объёма субстрата — 2 балла; от 40% до 60% объёма субстрата — 3 балла; от 60% до 80% объёма субстрата — 4 балла; от 80% до 100% объёма субстрата — 5 баллов.

Результаты и обсуждение

Анализ данных по степени зарастания субстратных площадок показал зависимость её от вида изучаемого субстрата и времени его подготовки (таблица 1).

Таблица 1

**Степень зарастания субстратных площадок (блоков)
в зависимости от вида субстрата и времени его подготовки**

Вид субстрата (А)	Время подготовки субстрата (В)	Степень зарастания (размножения мицелия вёшенки), %	
		%	балл
Пшеница зерно (А ₁)	15 минут (В ₁)	28	2
	30 минут (В ₂)	43	3
Среднее по фактору А ₁		36	
Ячмень зерно (А ₂)	15 минут (В ₁)	10	1
	30 минут (В ₂)	10	1
Среднее по фактору А ₂		10	
Овес зерно (А ₃)	15 минут (В ₁)	33	2
	30 минут (В ₂)	75	4
Среднее по фактору А ₃		70	

НСР₀₅ частных различий:

Фактора А 24
В 23

НСР₀₅ главных эффектов:

Фактора А 25
В 14

В среднем варианты, где в качестве субстрата для размножения мицелия использовали зерно овса, оказались более пригодными, чем другие изучаемые субстраты.

Данный субстрат показал наибольшую степень размножения культивируемого мицелия — 70 %, что существенно больше на 34–60 % по сравнению с зерном пшеницы и овса.

Время подготовки субстрата также оказало влияние на степень размножения мицелия вёшенки обыкновенной. Наиболее оптимальное время для подготовки субстрата составило 30 минут. В данном варианте подготовки на субстратной площадке с зерном овса получено максимальное размножение мицелия вёшенки — 75 % (4 балла), что выше на 42 % (2 балла), чем при подготовке субстрата продолжительностью 15 минут.

В других изучаемых вариантах время подготовки субстрата не оказало влияние на степень размножения мицелия вёшенки обыкновенной.

На степень размножения мицелия вёшенки оказало влияние и степень инфицированности субстратных площадок (таблица 2).

Таблица 2

**Степень инфицированности субстратных площадок (блоков)
в зависимости от вида субстрата и времени его подготовки**

Вид субстрата (А)	Время подготовки субстрата (В)	Степень инфицированности субстратных площадок, %
Пшеница зерно (А ₁)	15 минут (В ₁)	53
	30 минут (В ₂)	38
Среднее по фактору А ₁		46
Ячмень зерно (А ₂)	15 минут (В ₁)	90
	30 минут (В ₂)	85
Среднее по фактору А ₂		88
Овес зерно (А ₃)	15 минут (В ₁)	33
	30 минут (В ₂)	20
Среднее по фактору А ₃		27

Наименьшая степень инфицированности исследуемых субстратов была отмечена нами в вариантах с зерном овса — 27 %, в других вариантах она составила 46 и 90 %. При подготовке субстрата овса в течение 30 минут был отмечен минимальный процент инфицированности — 20 %. В других вариантах мы также отметили небольшую тенденцию к снижению инфицированности при подготовке субстрата продолжительностью 30 минут.

Выводы

На основании экспериментальных данных проведена разработка приемов технологии размножения мицелия вёшенки обыкновенной в непроизводственных условиях.

Установлено, что лучшим субстратом для размножения мицелия вёшенки обыкновенной является овес. На данном субстрате была получена наибольшая степень размножения мицелия вёшенки обыкновенной — 70 %. Оптимальное время для подготовки субстратов (обеззараживание субстрата провариванием) составило 30 минут.

Литература

1. Морозов А. И. Выращивание вёшенки / А. И. Морозов. — М.: ООО «Издательство АСТ»; Донецк: «Сталкер», 2003. — 46 с.
2. Размножение грибов на примере вешенки и строфарии [название с экрана]. <http://gribysedobnye.ru/razmnozhenie-gribov-na-primere-veshenki-i-strofarii.pg6.html>

3. Дудка И. А. Методы экспериментальной микологии // И. А. Дудка, С. П. Вассер, И. А. Элланская, Э. З. Коваль. — Киев.: Наукова Думка, 1982. — 552 с.
4. Моисейченко В. Ф. Основы научных исследований в агрономии: Учебник / В. Ф. Моисейченко и др.; под редакцией А. А. Белоусовой. — М.: Колос, 1996. — 336 с.

INFLUENCE OF TYPE OF SUBSTRATE AND DURATION OF ITS PREPARATION ON RATE OF REPRODUCTION OF *PLEUROTUS OSTREATUS* MYCELIUM

Seregin M.V.

*Perm State Agricultural Academy Named After Academician D. N. Pryanishnikov,
Perm*

Abstract. This paper presents the study of the influence of different substrate types on the basis of grains of cereal cultivars and the duration of their preparation on the rate of reproduction of the mycelium of *Pleurotus ostreatus*. The study was carried out in the school laboratory of Sheryinskaya secondary school at Nytvensky District of Perm krai. Oats were found to be the best substrate for reproduction of the mycelium of *Pleurotus ostreatus*. The highest rate of reproduction of the mycelium of *Pleurotus ostreatus* (70 %) was obtained on this substrate, due to its greater filminess.

The best way of substrate preparation is its boiling (disinfection) for 30 min.

Key words: *Pleurotus ostreatus*, type of substrate, grain, mycelium, rate of reproduction.

References

1. Morozov A.I. Vyrashhivanie vjoshenki / A.I. Morozov. — М.: ООО «Izdatel'stvo АСТ»; Doneck: «Stalker», 2003. — 46 с.
2. Razmnozhenie gribov na primere veshenki i strofarii [nazvanie s jekrana]. <http://gribysedobnye.ru/razmnozhenie-gribov-na-primere-veshenki-i-strofarii.pg6.html>
3. Dudka I.A. i dr. Metody jeksperimental'noj mikologii // I.A. Dudka, S.P. Vasser, I.A. Jellanskaja, Je.Z. Koval'. — Kiev.: Naukova Dumka, 1982. — 552 s.
4. Moisejchenko V.F. Osnovy nauchnyh issledovanij v agronomii: Uchebnik / V.F. Moisejchenko i dr.; pod redakciej A.A. Belousovoj. — М.: Kolos, 1996. — 336 с.