

М. Р. Хара, З. С. Гевик

## Статеві особливості реакції вегетативної нервової системи старих щурів на розвиток некротичного процесу в серці на тлі мелатоніну

ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет  
імені І. Я. Горбачевського МОЗ України»

**Ключові слова:** мелатонін, вегетативна нервова система, серце, адреналін, статеві.

**Мета роботи** – встановити статеві відмінності впливу мелатоніну на вегетативну регуляцію серця старих тварин в умовах патогенної дії адреналіну. На дорослих і старих самцях, самицях щурів дослідили вплив мелатоніну на вегетативну регуляцію серця в умовах його пошкодження. Некротичний процес у міокарді викликали введенням адреналіну (1 мг/кг, одноразово, внутрішньом'язово) через одну годину після ін'єкції мелатоніну (5 мг/кг внутрішньоочередно). Через 1 та 24 години після введення адреналіну визначали частоту серцевих скорочень та оцінили особливості вегетативної регуляції серця за показниками Мо (мода), АМо (амплітуда моди), ΔХ (варіаційний розмах кардіоінтервалів) та ІН (індекс напруження регуляторних механізмів).

**Встановили,** що ефекти мелатоніну, котрі спрямовані на зростання ролі холінергічної ланки АНС у формуванні ритму серця та зменшення участі адренергічної в організмі старих особин, суттєво зменшувалися. Передусім це стосувалося старих самців. У динаміці розвитку адреналінових некрозів характер вегетативної регуляції серцевого ритму старих щурів показував більшу, ніж у дорослих особин, роль адренергічної ланки у тварин обох статей, а зменшення впливу холінергічної – лише в старих самців, що мало наслідком більш суттєвого напруження регуляторних механізмів.

Результати засвідчили, що зі збільшенням віку щурів ефективність мелатоніну як препарату, котрий здатний впливати на вегетативну регуляцію серця шляхом активації кардіопротекторних впливів, зменшується, особливо в самців щурів.

## Половые особенности реакции вегетативной нервной системы старых крыс на развитие некротического процесса в сердце на фоне мелатонина

М. Р. Хара, З. С. Гевик

**Цель работы** – определить половые особенности влияния мелатонина на вегетативную регуляцию сердца старых животных в условиях патогенного действия адреналина. На взрослых и старых самцах, самках крыс исследовано влияние мелатонина на вегетативную регуляцию сердца в условиях его повреждения. Некротический процесс в миокарде вызвали введением адреналина (1 мг/кг однократно, внутримышечно) через 1 час после инъекции мелатонина (5 мг/кг внутривенно). Через 1 и 24 часа после введения адреналина определяли частоту сердечных сокращений и оценивали особенности вегетативной регуляции сердца по показателям Мо (мода), АМо (амплитуда моды), ΔХ (вариационный размах кардиоинтервалов) и ИН (индекс напряжения регуляторных механизмов).

**Установлено,** что эффекты мелатонина, направленные на рост роли холинергического звена АНС в формировании ритма сердца и уменьшение участия адренергического в организме старых особей существенно уменьшалось. В большей степени это касалось старых самцов. В динамике развития адреналиновых некрозов характер вегетативной регуляции сердечного ритма старых крыс отражал большую, чем у взрослых особей, роль адренергического звена у животных обоих полов, а уменьшение влияния холинергического – только у старых самцов и как следствие – более существенное напряжение регуляторных механизмов.

Полученные результаты показывают, что с увеличением возраста крыс эффективность мелатонина как препарата, способного влиять на вегетативную регуляцию сердца путём активации кардиопротекторных воздействий, уменьшается, особенно у самцов крыс.

**Ключевые слова:** мелатонин, вегетативная нервная система, сердце, адреналин, пол.

**Патология.** – 2016. – №1 (36). – С. 15–18

## Sexual features of the old rats' autonomic nervous system response to the development of necrotic process in heart on the background of melatonin

M. R. Khara, Z. S. Hevyk

**Aim.** An effect of melatonin on the autonomic regulation of the heart in terms of damage was studied in adult and old male and female rats.

**Methods and results.** Necrotic process in the myocardium was caused by the injection of epinephrine (1 mg / kg, single dose, intramuscular) 1 h after injection of melatonin (5 mg / kg intravenous). In 1 and 24 hours after administration of epinephrine heart rate was determined and features of autonomic regulation of the heart on indicators Mo (mode), АМо (mode amplitude), ΔН (variation range of cardio intervals), and SI (stress index of regulatory mechanisms) were evaluated. It was found that the effects of melatonin aimed at increasing the role of cholinergic ANS link in the formation of heart rate and reducing the adrenergic participation in the body of older individuals significantly decreased. To a greater extent this applies to older males. In the dynamics of adrenalin necrosis the character of vegetative regulation of heart rate of old rats reflects greater, than in adults, role of adrenergic link in animals of both sexes and reduce of the impact of cholinergic one – only in older males, which resulted in a significant tension of regulatory mechanisms.

**Conclusion.** The obtained results show that with increasing age in rats effectiveness of melatonin as a drug which can affect the autonomic regulation of the heart by activating cardio-protective effects decreases, especially in male rats.

**Key words:** Melatonin, Autonomic Nervous System, Heart, Adrenaline, Sex.

**Pathologia.** 2016; №1 (36): 15–18

Збереження актуальності проблеми серцево-судинних захворювань натеper зумовлене збільшенням тривалості життя та кількості старих людей у популяції. Вважається, що до 2050 року кількість людей похилого віку перевищить показник молодих [1]. У більшості розвинутих країн подібні зміни у пропорційному співвідношенні між молодими і старими людьми відбулися вже до 1998 року [2]. Такий стан речей вимагає достатнього обсягу знань щодо механізмів перебігу патологічних процесів у міокарді старих осіб, зокрема тих, що виникають унаслідок його некрозу, для формування ефективної стратегії догляду та лікування. Важлива роль у кардіопротекції відводиться стрес-лімітуючим чинникам, серед них цікавим і перспективним є гормон шишкоподібної залози мелатонін. Окрім антиоксидантних властивостей [3,4] йому притаманна властивість впливати на рецепторну систему серця [5,6]. Однак дотепер невивченим залишається статевий аспект кардіопротекторної ефективності мелатоніну, що є важливим з огляду на переважання частки жінок у людській популяції.

### Мета роботи

Встановити статеві відмінності впливу мелатоніну на вегетативну регуляцію серця старих тварин в умовах патогенної дії адреналіну.

### Матеріали і методи дослідження

Досліди здійснили на білих лабораторних самцях (♂) і самицях (♀) шурів, в яких відтворювали некротичний процес у міокарді введенням одномоментно внутрішньом'язово адреналіну (1 мг/кг). Вік дорослих тварин становив 6–8 місяців (маса – 170–240 г), а вік старих тварин – 20–21 місяць (маса – 250–335 г). Мелатонін (Мел.) вводили за 1 годину до цього (5 мг/кг, у черевну порожнину). У II стандартному відведенні реєстрували електрокардіограму з використанням комп'ютерного комплексу «Кардіолаб-СЕ». Визначали тривалість 1000

послідовно розташованих кардіоінтервалів R-R із точністю до 0,001 секунди та здійснювали математичний аналіз серцевого ритму за Р. Баєвським [7] на 1 та 24 годинах основного експерименту. Для виконання дослідження тваринам у черевну порожнину вводили тіопентал натрію (40 мг/кг). Для оцінювання активності адренергічної та холінергічної ланок автономної нервової системи (АНС) визначали такі показники: Мо (мода – тривалість інтервалу R-R, котрий на досліджуваному відрізку електрокардіограми траплявся найчастіше, показували в секундах (с); АМо (амплітуда моди – кількість кардіоінтервалів, що відповідають значенню моди у відсотках (%); ΔX (варіаційний розмах кардіоінтервалів, обчислюється як різниця між найбільшим і найменшим значеннями тривалості R-R, показується в секундах (с); ІН (індекс напруження, обчислювали за формулою  $ІН = АМо / (2 \cdot \Delta X \cdot Мо)$ ). Статистичний аналіз здійснили за допомогою методів варіаційної статистики. Визначали середнє арифметичне (М), стандартну похибку середнього арифметичного (m), критерій Манна-Уїтні (U) та показник вірогідності різниці між середніми величинами (р). Відмінність між середніми арифметичними величинами вважали вірогідною при значенні  $p \leq 0,05$ .

### Результати та їх обговорення

Дослідження засвідчили, що розвиток некротичного процесу в серці старих самців на тлі мелатоніну викликав іншу, ніж у дорослих, закономірність змін ЧСС. На відміну від дорослих особин, в яких цей показник збільшувався на 1 годину патології та відновлювався до 24 годин, у старих він постійно наростав і на етапі максимального некрозоутворення (24 години після введення адреналіну) переважав контрольне значення на 57% (табл. 1). У старих самиць закономірність динаміки ЧСС була аналогічною такій у дорослих, але інтенсивність змін – суттєвішою. Так, якщо на 24 годину експерименту

Таблиця 1

### Динаміка ЧСС і показників кардіоінтервалометрії під час розвитку некротичного процесу в серці самців і самиць різного віку на тлі мелатоніну

Стать	1 група – дорослі тварини			2 група – старі тварини		
	Мел.	Мел.+А 1 год	Мел.+А 24 год	Мел.	Мел.+А 1 год	Мел.+А 24 год
ЧСС						
♂	408±5 <sup>2,3</sup>	501±5 <sup>1,2,3</sup>	415±3 <sup>2,3</sup>	491±10 <sup>2,3</sup>	557±8 <sup>1,3</sup>	652±7 <sup>1,2,3</sup>
♀	383±2 <sup>2,3</sup>	435±10 <sup>1,2,3</sup>	481±11 <sup>1,2</sup>	343±12 <sup>2,3</sup>	533±6 <sup>1,3</sup>	502±4 <sup>1,2</sup>
Мо (сек·10 <sup>-2</sup> )						
♂	14,6±0,2 <sup>2,3</sup>	11,9±0,1 <sup>1,2,3</sup>	14,4±0,1 <sup>2,3</sup>	12,2±0,3 <sup>2,3</sup>	10,8±0,1 <sup>1,2,3</sup>	9,2±0,1 <sup>1,2,3</sup>
♀	15,7±0,1 <sup>2,3</sup>	13,9±0,3 <sup>1,2,3</sup>	12,5±0,3 <sup>1,2,3</sup>	17,6±0,6 <sup>2,3</sup>	11,3±0,1 <sup>1,2,3</sup>	11,9±0,1 <sup>1,2,3</sup>
АМо (%)						
♂	19,6±0,6 <sup>2,3</sup>	53,7±1,3 <sup>1,2,3</sup>	23,2±1,2 <sup>1,2,3</sup>	45,8±1,5 <sup>2,3</sup>	63,6±3,1 <sup>1,3</sup>	86,1±0,6 <sup>1,2,3</sup>
♀	34,2±0,7 <sup>2,3</sup>	34,9±0,4 <sup>2,3</sup>	34,1±1,7 <sup>2,3</sup>	20,9±0,6 <sup>2,3</sup>	72,0±1,5 <sup>1,3</sup>	55,0±0,7 <sup>1,2,3</sup>
ΔX (сек·10 <sup>-2</sup> )						
♂	0,92±0,04 <sup>2,3</sup>	0,53±0,03 <sup>3</sup>	0,97±0,06 <sup>2,3</sup>	0,47±0,04 <sup>2,3</sup>	0,33±0,02 <sup>2,3</sup>	0,22±0,02 <sup>2,3</sup>
♀	0,63±0,03 <sup>2</sup>	0,57±0,02	0,62±0,05 <sup>2</sup>	0,67±0,04 <sup>2</sup>	0,50±0,04 <sup>2</sup>	0,67±0,04 <sup>2</sup>
ІН						
♂	7359±395 <sup>2</sup>	42990±2552 <sup>2</sup>	8553±798 <sup>2</sup>	41242±2703 <sup>2</sup>	90425±7209 <sup>2</sup>	222047±14635 <sup>2</sup>
♀	17415±1036 <sup>2</sup>	22231±848 <sup>2</sup>	23662±3754 <sup>2</sup>	9097±564	66899±6559 <sup>2</sup>	35214±2094 <sup>2</sup>

Примітки: <sup>1</sup> – вірогідна ( $p \leq 0,05$ ) відмінність щодо контролю; <sup>2</sup> – між самцями і самицями; <sup>3</sup> – між старими та дорослими тваринами.

значення ЧСС у дорослих самиць зросло проти контролю на 26%, то в старих – на 46%. Порівняння абсолютних значень тварин різної статі показало, що, на відміну від когорти дорослих особин, де значення ЧСС на цьому етапі розвитку некротичного процесу в серці самиць, виявилось на 16% більшим, ніж у самців, у когорті старих особин навпаки було на 30% меншим. Така різниця показує не лише різні механізми адаптації серця в умовах, що відтворили, але й меншу чутливість старих самців до ефектів мелатоніну. Це підтверджується й наявністю аналогічної різниці в контролі, адже як у дорослих, так і у старих самиць ЧСС була вірогідно меншою.

Аналіз показників кардіоінтервалометрії показав: в регуляції ритму серця старих самиць активність холінергічної ланки автономної нервової системи проявлялася суттєвіше, ніж у самців. Адже значення ІН, що відбиває баланс активності обох ланок АНС, у старих самиць контрольної групи на 1 та 24 годину розвитку некротичного процесу в серці було меншим, ніж у старих самців – відповідно в 4,5 раза, 1,4 раза та 6,3 раза. Поряд із тим особливістю старих особин було те, що здатність мелатоніну сприяти кардіопротекції шляхом підсилення стрес-лімітуючих реакцій організму зменшилася. Адже цей показник як у старих самців, так і в старих самиць виявився більшим, що свідчило про суттєвіше напруження регуляторних механізмів, і передусім це стосувалося самців.

При цьому значення Мо в особин жіночої статі було вірогідно більшим, ніж у самців аналогічного віку, на 44% – в контролі, 5 та 29% відповідно на 1 та 24 годину розвитку некротичного процесу, що демонструвало менший у самиць вплив адренергічних механізмів, котрі реалізують свої ефекти через гуморальний канал (головним чином, через надниркові залози) [7,9]. Відмінність за значенням АМо також підтверджувала меншу участь адренергічної складової в регуляції ритму серця. Окрім того, у старих самиць вірогідно більшою була варіабельність серцевого ритму, що підтверджувалося переважанням значення  $\Delta X$  над порівнюваним у старих самців і показувало активнішу участь блукаючого нерва у формуванні ритму серця. Якщо у старих самиць це було результатом меншого значного впливу мелатоніну на адренергічну складову вегетативної регуляції при збереженні здатності впливати на холінергічну, то в самців – шляхом зменшення ефективності гормону визначати не тільки активність адренергічної, але й холінергічної ланок АНС. Оцінювання інтегрального показника ІН дає можливість стверджувати, що у старих тварин обох статей баланс активності ланок АНС зміщувався в бік переважання адренергічної. У старих самців, на від-

міну від самиць, це було наслідком не лише посилення адренергічних впливів, що реалізують свої ефекти через гуморальний і нервовий канали (підтверджувалося зменшенням Мо та збільшенням АМо), але й значним обмеженням холінергічних, про що свідчило в 4,4 раза менше, ніж у дорослих особин значення  $\Delta X$ , котре показує активність блукаючого нерва у формуванні ритму серця [7,8]. Дослідження старих щурів за аналогічної моделі пошкодження міокарда, але без застосування коригувальних засобів також засвідчили, що розвиток некротичного процесу в серці відбувається на тлі домінування адренергічних механізмів [9]. Зважаючи на дані про вікове зменшення холінореактивності пейсмейкерів синусового вузла, що підтверджено попередніми дослідженнями [10], та значне обмеження участі парасимпатичної ланки АНС в регуляції ритму серця старих самців (значне в порівнянні з дорослими тваринами зменшення варіабельності кардіоінтервалів) в умовах патології, дає змогу стверджувати про зменшення стрес-лімітуючих ефектів мелатоніну саме у тварин цієї статі.

#### Висновки

1. Ефекти мелатоніну, котрі спрямовані на зростання ролі холінергічної ланки автономної нервової системи у формуванні ритму серця та зменшення участі адренергічної, у старих щурів суттєво зменшуються, що більшою мірою виявляється в самців.

2. Під час розвитку некротичного процесу в серці старих щурів, незважаючи на застосування мелатоніну, зростає вплив адренергічної ланки в діяльності серця та напруження регуляторних механізмів, що також є суттєвішим у самців. Зменшення впливу холінергічної ланки за таких умов характерне тільки для особин чоловічої статі, що загалом демонструє в них більш суттєве зменшення ефективності мелатоніну як кардіопротектора.

**Перспективи подальших досліджень.** Дослідження показали, що з віком чутливість автономної нервової системи до ефектів мелатоніну, котрі пов'язані зі здатністю гормону впливати на активність регуляторних ланок і визначати ритм серця, зменшується. Більш суттєві зміни виникають в організмі самців-щурів, що може стати основою для інтенсивніших проявів десинхронізації, підґрунтям для зменшення ефективності стрес-лімітуючих реакцій за участі цього гормону в умовах стресу. Наявність статевої відмінності демонструє необхідність гендерного підходу до загального оцінювання ефективності мелатоніну як кардіопротектора.

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

#### Список літератури

1. Lakatta E.G. Perspectives on mammalian cardiovascular aging: Humans to molecules / E.G. Lakatta, S.J. Sollott // *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* – 2002. – Vol. 132. – №4. – P. 699–721.
2. Weisz D. Gender and the treatment of heart disease in older persons in the United States, France, and England: a comparative, population-based view of a clinical phenomenon / D. Weisz, M. Gusmano, V.G. Rodwin // *Gender medicine.* – 2004. – Vol. 1. – №1. – P. 29–40.
3. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger / D.X. Tan, R.J. Reiter, L.C. Manchester et al. // *Curr. Top. Med. Chem.* – 2002. – Vol. 2. – №2. – P. 181–197.

4. On the in vitro antioxidative properties of melatonin / I. Gulcin, M.E. Buyukokuroglu, M. Oktay, O.I. Kufrevioglu // *J. Pineal Res.* – 2002. – Vol. 33. – №3. – P. 167–171.
5. Triazolam and melatonin effects on cardiac autonomic function during sleep / L. Ferini-Strambi, A. Oldani, M. Zucconi et al. // *Clin. Neuropharmacol.* – 1995. – Vol. 18. – №5. – P. 405–409.
6. Wagner G. Adrenergic and cholinergic regulation of in vitro melatonin release during ontogeny in the pineal gland of Long Evans rats / G. Wagner, R. Brandstätter, A. Hermann // *Neuroendocrinology.* – 2000. – Vol. 72. – №3. – P. 154–161.
7. Баевский Р.М. Вариабельность сердечного ритма: теоретические аспекты и возможности клинического применения / Р.М. Баевский, Г.Г. Иванов // *Ультразвуковая и функциональная диагностика.* – 2001. – №3. – С. 108–127.
8. Хара М.Р. Гендерні та вікові відмінності реагування пейсмеркерів синусового вузла на введення природних та синтетичних середників в умовах кардіонекрозу / М.Р. Хара, Г.С. Сатурська, А.А. Лепявко // *Безпечна фармакотерапія в Україні : наук.-практ. конф., (29–30 жовтня 2008 р.) : матеріали конф.* – Тернопіль : Укрмедкнига, 2008. – С. 65–66.
9. Лепявко А.А. Порівняльна характеристика автономної регуляції серця, пошкодженого адреналіном, у різностатевих щурів при старінні / А.А. Лепявко, М.Р. Хара // *Здобутки клінічної і експертної медицини.* – 2008. – №1. – С. 44–47.
10. Хара М.Р. Особливості холінергічних реакцій ушкодженого адреналіном серця у різностатевих щурів залежно від віку / М.Р. Хара, А.А. Лепявко // *Патологія.* – 2008. – Т. 5. – №2. – С. 103.
1. Lakatta, E., & Sollott, S. (2002). Perspectives on mammalian cardiovascular aging: humans to molecules. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 132(4), 699–721. doi: 10.1016/S1095-6433(02)00124-1.
2. Weisz, D., Gusmano, M. K., & Rodwin, V. G. (2004). Gender and the treatment of heart disease in older persons in the United States, France, and England: a comparative, population-based view of a clinical phenomenon. *Gender Medicine*, 1(1), 29–40. doi: 10.1016/S1550-8579(04)80008-1.
3. Tan, D., Reiter, R., Manchester, L., Yan, M., El-Sawi, M., Sainz, R., et al. (2002). Chemical and Physical Properties and Potential Mechanisms: Melatonin as a Broad Spectrum Antioxidant and Free Radical Scavenger. *CTMC*, 2(2), 181–197. doi: 10.2174/1568026023394443.
4. Gulcin, I., Buyukokuroglu, M., Oktay, M., & Kufrevioglu, O. (2002). On the in vitro antioxidative properties of melatonin. *J Pineal Res*, 33(3), 167–171. doi: 10.1034/j.1600-079X.2002.20920.x.
5. Ferini-Strambi, L., Oldani, A., Zucconi, M., Stankov, B., Castronovo, C., Frascini, F., & Smirne, S. (1995). Triazolam and Melatonin Effects on Cardiac Autonomic Function During Sleep. *Clinical Neuropharmacology*, 18(5), 405–409.
6. Wagner, G., Brandstätter, R., & Hermann, A. (2000). Adrenergic and Cholinergic Regulation of in vitro Melatonin Release during Ontogeny in the Pineal Gland of Long Evans Rats. *Neuroendocrinology*, 72(3), 154–161. doi: 10.1159/000054582.
7. Baevskii, R., & Ivanov, G. (2001). Variabel'nost' serdechnogo ritma: teoreticheskie aspekty i vozmozhnosti klinicheskogo primeneniya [Heart rate variability: theoretical aspects and clinical applications]. *Ul'trazvukovaya i funktsional'naya diagnostika*, 3, 108–127. [in Russian].
8. Khara, M. R., Satureska, H. S., & Lepiavko, A. A. (2008) Henderni ta vikovi vidminnosti reahuvannia peismekeriv synusovoho vuzla na vvedennia pryrodnykh ta syntetychnykh serednykiv v umovakh kardionekrozu [Gender and age differences pacemakers sinus response to the introduction of natural and synthetic in terms of the means kardionekrozu]. *Bezpechna farmakoterapiia v Ukraini*. Proceedings of the Scientific and Practical Conference, (S. 65–66). Ternopil : Ukrmedknyha. [in Ukrainian].
9. Lepiavko, A. A., & Khara, M. R. (2008) Porivnialna kharakterystyka avtonomnoi rehuliatsii sertsia, poshkodzhenoho adrenalinom, u riznostatevykh shchuriv pry starinni [Comparative characteristics of autonomic regulation of the heart damaged adrenaline in rats with aging heterosexual]. *Zdobutky klinichnoi i ekspertnoi medytsyny*, 1, 44–47. [in Ukrainian].
10. Khara, M. R., & Lepiavko, A. A. (2008) Osoblyvosti kholinergichnykh reaktsii ushkodzhenoho adrenalinom sertsia u riznostatevykh shchuriv zalezho vid viku [Features cholinergic reactions adrenaline damaged hearts in rats heterosexual depending on age]. *Patohiia*, 5(2), 103. [in Ukrainian].

#### Відомості про авторів:

Хара М. Р., д-р мед. наук, професор каф. патологічної фізіології, ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України».

Гевик З. С., асистент каф. хірургічної стоматології, ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МЗ України», E-mail: zor.7@yandex.ua.

#### Сведения об авторах:

Хара М. Р., д-р мед. наук, профессор каф. патологической физиологии, ГВУЗ «Тернопольский государственный медицинский университет имени И. Я. Горбачевского МЗ Украины».

Гевик З. С., ассистент каф. хирургической стоматологии, ГВУЗ «Тернопольский государственный медицинский университет имени И. Я. Горбачевского МЗ Украины», E-mail: zor.7@yandex.ua.

#### Information about authors:

Khara M. R., MD, PhD, DSci, Professor of the Department of Pathophysiology, SHEI «I. Horbachevsky Ternopil State Medical University of Ministry of Health of Ukraine».

Hevyk Z. S., Assistant of the Department of Operative Dentistry, SHEI «I. Horbachevsky Ternopil State Medical University of Ministry of Health of Ukraine», E-mail: zor.7@yandex.ua.

Надійшла в редакцію 25.01.2016 р.