

USE OF IMMUNOENZYME ASSAY OF SALIVA IN THE ASSESSMENT OF FUNCTIONAL BODY RESERVES AT A YOUNG AGE

Levchenko V.A.

ЗАСТОСУВАННЯ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ СЛИНИ В ОЦІНЦІ ФУНКЦІОНАЛЬНИХ РЕЗЕРВІВ ОРГАНІЗМУ В ЮНАЦЬКОМУ ВІЦІ



ЛЕВЧЕНКО В.А.

Прикарпатський національний університет ім. Василя Стефаника, ДВНЗ "Івано-Франківський національний медичний університет" УДК 616.85-009.86

Ключові слова:
імуноферментний аналіз, слина, кортизол, тестостерон.

станніми роками слину використовують як унікальний об'єкт дослідження у процесі спортивної й відновної медицини в якості діагностичного середовища [1], оскільки у слині міститься ряд біомаркерів, що відображають вплив психоемоційного напруження, фізичного навантаження на найважливіші нейрорегуляторні системи організму [2].

Значного поширення набули імуноферментні дослідження, присвячені вивченню динаміки рівня стероїдних гормонів при фізичному навантаженні. Це зумовлене тим, що гормони кори наднирників є одними з основних реагентів, які забезпечують розвиток адаптаційного синдрому [3, 4]. Адаптація до стресорного впливу — це складний багаторівневий процес, який відбувається на субклітинному, клітинному, органному та системному рівнях з каскадною мультигормональною реакцією, де значна роль відводиться гіпоталамо-гіпофізарно-наднирниковій

осі, в якій одне з провідних місць посідають кортизол і тестостерон [4, 5].

Відомо, що інтенсивні та тривалі фізичні навантаження супроводжуються функціонально-морфологічними змінами нейрогуморальної регуляції, у тому числі у тканинах наднирників, що призводить до зміни секреції кортикостероїдних гормонів, певних реакцій з боку органів-мішеней в умовах стресу, що відображає стан функціональних резервів організму [6, 7]. Тому розробка способів оцінки стану функціональних резервів на основі вивчення впливу короткочасного високоінтенсивного навантаження на рівень тестостерону і кортизолу у слині з застосуванням імуноферментних наборів є перспективним напрямком досліджень. У більшості випадків контроль над станом адаптації організму до інтенсивних та тривалих фізичних навантажень ще здійснюється за динамікою суб'єктивної картини, за інтегральними

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА СЛЮНЫ В ОЦЕНКЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ РЕЗЕРВОВ ОРГАНИЗМА В ЮНОШЕСКОМ ВОЗРАСТЕ

Левченко В.А.

Цель работы — изучение возможности использования иммуноферментного анализа слюны для оценки функциональных резервов в юношеском возрасте путем исследования динамики тестостерон-кортизолового соотношения в условиях стресс-теста.

Мериалы и методы. Обследовались молодые люди 18-19 лет (29 девушек и 15 юношей) с разной степенью физической подготовки. Оценивали толерантность к физической нагрузке в условиях тредмил-теста, максимальную аэробную мощность. В слюне определяли иммуноферментным способом базальный уровень тестостерона и кортизола, их динамику, соотношение на высоте стресс-теста. Для этого использовали наборы Salivary Cortisol et Testosterone ELISA KIT (Германия).

Результаты. Установлено, что у юношей и девушек, систематически занимавшихся в спортивных секциях, показатели кортизола и тестостерона в слюне умеренно повышались

на высоте тредмил-теста ($11,73 \pm 0,63$) МЕТ и ($11,07 \pm 0,69$) МЕТ. В группе молодых людей, которые не занимались физической подготовкой, выявлено снижение показателей тестостерона и у юношей, и у девушек соответственно на 5,23% ($p < 0,05$) и 11,84% ($p < 0,05$) на фоне сниженной толерантности к физической нагрузке ($7,92 \pm 0,60$) МЕТ и ($8,45 \pm 0,52$) МЕТ. При этом прирост кортизола на высоте стресс-теста превышал результат, полученный в первой группе. В группе девушек с соматоформной вегетативной дисфункцией базальные показатели кортизола ($5,42 \pm 0,31$) пг/мл и тестостерона ($21,36 \pm 0,72$) нмоль/л были достоверно ниже результатов, полученных у девушек первых двух групп.

На высоте достигнутой нагрузки тестостерон дополнительно снижался ($18,36 \pm 0,74$) нмоль/л ($p < 0,05$) на фоне значительного повышения показателей кортизола ($7,28 \pm 0,43$) пг/мл ($p < 0,05$). Выявленное снижение тестостерон-кортизолового соотношения в слюне при низкой толерантности к физической нагрузке может быть маркером ухудшения функциональных резервов в юношеском возрасте.

Ключевые слова: иммуноферментный анализ, слюна, кортизол, тестостерон.

© Левченко В.А. СТАТТЯ, 2015.

показниками кардіореспіраторної системи [8]. Однак вони мало відображають стан гормональної регуляції організму у фазі стресорного напруження, у фазі опору [5]. Тому являє інтерес визначення імуноферментним способом зв'язку між ступенем фізичної підготовки молодих людей і динамікою рівня кортизолу і тестостерону, тестостерон-кортизолового співвідношення у слині на висоті стрес-тесту.

Представлені результати дослідження є фрагментом комплексної роботи "Статевий диморфізм у механізмах адаптації до стресорних навантажень в юнацькому віці під час спортивно-оздоровчих занять" (державний реєстраційний номер 0113U002431).

Метою дослідження було вивчення можливості застосування імуноферментного аналізу для оцінки функціональних резервів в юнацькому віці шляхом дослідження динаміки тестостерон-кортизолового співвідношення у слині в умовах стрес-тесту.

Матеріал і методи дослідження. Обстежувалися молоді люди 18-19 років, студенти Прикарпатського національного університету (29 дівчат і 15 хлопців), яких було поділено на три групи. Першу групу склали 15 осіб — 7 хлопців і 8 дівчат, які

регулярно відвідували спортивні секції з футболу і баскетболу протягом останніх 2-3 років. До другої групи увійшли 18 молодих людей, які не займалися фізичною підготовкою (8 хлопців і 10 дівчат). До третьої групи включено 11 дівчат з нейроциркуляторною дистонією (НЦД) за гіпотонічним типом, що супроводжується низькою фізичною працездатністю. При цьому виключалася ендокринна патологія.

Рівень тестостерону і кортизолу у слині визначали імуноферментним методом. Подібна неінвазивна методика не потребує екстракції, досить точно відображає вміст вільного кортизолу і тестостерону у крові і широко використовується для динамічного контролю рівня гормонів [9, 10]. У дослідженні використовували ферментозв'язані імуносорбентні набори Salivary Cortisol et Testosterone ELISA KIT (Німеччина). Слину збирали вранці до навантаження і на висоті тредміл-тесту [2]. Рівень гормонів у слині визначався на імуноаналізаторі "Stat Fax 303 Plus" (USA). У дівчат визначали концентрацію кортизолу і тестостерону у лютеїновій фазі. При цьому визначали тестостерон-кортизолове співвідношення (ТКС) [7].

Для стрес-тесту застосовували тредміл (Biomedical Systems), за протоколом Брюса, зі ступінчасто-зростаючою потужністю, тривалістю одного ступеня 3 хв., кут нахилу змінювався кожні 3 хв. (підйом на 5 см відносно медіани доріжки відповідав 5° (2,5°), до досягнення субмаксимальної ЧСС. Толерантність до навантаження оцінювали у METax [8]. Під час стрес-тесту визначалася максимальна аеробна потужність (max VO₂, ml/kg/min)

за допомогою програмного забезпечення тредмілу.

Для оцінки ступеня вірогідності результатів дослідження застосовували варіаційно-статистичний метод аналізу отриманих результатів з використанням пакета статистичних програм Statistica v. 6.1 (США).

Результати дослідження та їх обговорення. За результатами дослідження було встановлено, що у першій групі молодих людей на висоті тредміл-тесту відзначалося достовірне зростання рівня кортизолу і тестостерону (табл.). Так, рівень кортизолу і тестостерону серед хлопців на висоті навантаження ($11,73 \pm 0,63$) MET достовірно зріс відповідно на ($14,8 \pm 1,71$)% і ($18,38 \pm 2,11$)%. Аналогічні зміни також виявлялися серед дівчат цієї групи — зростання показників кортизолу і тестостерону на висоті стрес-тесту ($11,07 \pm 0,69$) MET відповідно на ($15,9 \pm 1,19$)% і ($13,0 \pm 1,69$)%. Таким чином, приріст тестостерону серед тренуваних молодих людей, незалежно від статі, зростав синхронно з підйомом рівня кортизолу. Подібні зміни можна пояснити компенсаторною реакцією тестостерону, спрямованою на гальмування катаболічної та антианаболічної дії кортизолу, тобто відзначається збалансована реакція стероїдних гормонів.

У другій групі толерантність до фізичного навантаження і у хлопців, і дівчат відповідно ($7,92 \pm 0,60$) MET і ($8,45 \pm 0,52$) MET була достовірно нижчою від результатів, отриманих у першій групі. На висоті стрес-тесту відзначалося достовірне зростання показників кортизолу і у хлопців, і у дівчат відповідно на ($19,67 \pm 1,43$)% і ($18,42 \pm 1,06$)% ($p < 0,05$). При цьому відсотковий приріст кортизолу на висоті навантаження у другій групі студентів переважав результати приросту у першій групі. Водночас показник тестостерону на висоті навантаження достовірно знизився: у дівчат — на 11,84% ($p < 0,05$), у хлопців — на 5,23% ($p < 0,05$). У 3-й групі дівчат з вегетативною дисфункцією базальні показники кортизолу ($5,42 \pm 0,31$) пг/мл і тестостерону ($21,36 \pm 0,72$) нмоль/л були достовірно нижчими від результатів, отриманих у дівчат першої і другої груп. Таким чи-

Таблиця

Показники рівня кортизолу і тестостерону у слині молодих людей на висоті тредміл-тесту

Група студентів	Кортизол (пг/мл)		Тестостерон (нмоль/л)	
	у спокої	тредміл-тест	у спокої	тредміл-тест
1 гр. хлопці (n=7)	6,39±0,38	7,50±0,44*	184,57±10,94	226,14±16,36*
1 гр. дівчата (n=8)	6,61±0,45	7,88±0,40*	25,13±1,12	28,88±1,47*
2 гр. хлопці (n=8)	6,29±0,52	7,83±0,31*	174,5±3,00	165,38±5,10
2 гр. дівчата (n=10)	6,73±0,50	8,25±0,56*	24,50±0,97	21,60±0,72
3 гр. дівчата ((n=11)	5,42±0,31	7,28±0,43*	21,36±0,95	18,36±0,74*

Примітка: * — ступінь достовірності ($< 0,05$).

USE OF IMMUNOENZYME ASSAY OF SALIVA
IN THE ASSESSMENT OF FUNCTIONAL BODY
RESERVES AT A YOUNG AGE

Levchenko V.A.

Objective. We studied the possibility of the use of saliva enzyme immunoassay for the assessment of functional reserves at a young age by means of the study of the dynamics of testosterone-cortisol ratio in a stress-test.

Materials and methods. Young people aged 18-19 years (29 girls and 15 boys) with the different degrees of physical fitness were examined. We assessed a tolerance to physical load under conditions of a treadmill-test and maximal aerobic power. The basal levels of testosterone and cortisol, their dynamics, the ratio at height of stress test were determined in saliva by ELISA method with the application of the sets of Salivary Cortisol et Testosterone ELISA KIT (Germany).

Results. The indices of cortisol and testosterone in saliva were determined to be moderately increased in the young men and women who regularly were engaged in sport sections at height of treadmill test ($11,73 \pm 0,63$) MET and ($11,07 \pm 0,69$) MET,

respectively. Declines in testosterone indices in the group of young people, both in boys and girls by 5.23% ($p < 0.05$) and 11.84% ($P < 0.05$) respectively, who were not engaged in physical training, were revealed on the background of the decreased tolerance to physical load ($7,92 \pm 0,60$) MET and ($8,45 \pm 0,52$) MET. At the same time the increase of cortisol at height of the stress test increased the result obtained in the first group. In the group of the girls with somatoform vegetative dysfunction, basal cortisol indices ($5,42 \pm 0,31$) pg/ml and testosterone ($21,36 \pm 0,72$) nmol/l were authentically lower than the results obtained in the girls of the first two groups. At height of the reached load the testosterone was decreased additionally ($18,36 \pm 0,74$) nmol/l ($p < 0.05$) against the background of a significant increase of the cortisol indices ($7,28 \pm 0,43$) pg/ml ($p < 0,05$). The revealed decrease in saliva testosterone-cortisol ratio at a low tolerance to a physical load may be a marker of the deterioration of functional reserves at a young age.

Keywords: enzyme immunoassay, saliva, cortisol, testosterone.

ном, можна думати, що у дівчат з проявами гіпотонічного типу НЦД низький базальний рівень кортизолу і тестостерону не викликає стимуляцію секреції гіпоталамусом відповідних релізинг-гормонів. В умовах стрес-тесту показники кортизолу у цій групі збільшилися на ($25,55 \pm 2,38$)% ($p < 0,001$), а тестостерону — знизився на 14,04%, до ($18,36 \pm 0,65$) нмоль/л ($p < 0,05$).

Дослідження тестостерон-кортизолового співвідношення на висоті навантаження виявили, що у хлопців 1 гр. ТКС не зазнало достовірних змін, у 2 гр. — зменшилося на ($23,86 \pm 1,12$)% ($p < 0,05$) за рахунок достовірного зростання кортизолу на 24,48% і зменшення тестостерону на 5,23%. У дівчат 1 групи показник ТКС на висоті тредміл-тесту достовірно не змінювався, у дівчат 2 групи знизився на ($28,54 \pm 1,33$)% ($p < 0,05$), у 3-й — на ($36,04 \pm 1,43$)% ($p < 0,05$).

Отримані результати ТКС свідчать про те, що у молоді, яка регулярно не займається фізичною підготовкою, і у дівчат з проявами НЦД на висоті навантаження відзначався значний приріст кортизолу на тлі зниження показників тестостерону.

Крім того, зміни ТКС на висоті стрес-тесту у хлопців і дівчат 2 гр. супроводжувалися зниженням показників max VO₂ відповідно до ($29,65 \pm 1,19$) мл/кг/хв і ($24,3 \pm 1,56$) мл/кг/хв порівняно з результатами, отриманими у 1 гр. дослід-

жуваних відповідно ($39,28 \pm 2,04$) мл/кг/хв і ($37,17 \pm 2,38$) мл/кг/хв.

Аналогічні зміни виявлялися у дівчат третьої групи. Це свідчить про те, що "кисневе виснаження" швидше виникає серед хлопців і дівчат, в яких під час навантаження знижується рівень тестостерону на тлі значного приросту показників кортизолу.

Виявлені порушення балансу між кортизолом і тестостероном на висоті стрес-тесту серед молодих людей зі зниженою толерантністю до фізичних навантажень на користь кортизолу можуть обмежувати фізичну активність людини через здатність кортизолу погіршувати периферичний кровообіг, викликати катаболічний ефект, знижувати м'язовий тонус на висоті гострого чи тривалого фізичного напруження, можливо, і через зниження рівня його метаболічного антагоніста тестостерону [11, 12].

У дівчат з проявами соматоформної вегетативної дисфункції зниження базального рівня кортизолу можна розцінювати як прояв функціональної гіпоадренії [12, 13]. Відомо, що низький рівень кортизолу зменшує вазоконстрикторний ефект епінерфіну, глюкогенез, що обмежує фізичну активність, викликає дестабілізацію НЦД за гіпотонічним типом. При цьому низький рівень тестостерону зменшує модулюючий вплив на серцево-судинну систему симпатичної і пара-

симпатичної нервової систем [5, 12].

Надмірний приріст показника кортизолу на висоті стрес-тесту серед молодих людей зі зниженою толерантністю до фізичного навантаження (гіподинамія, НЦД) може свідчити про розлади зворотного зв'язку з гіпоталамусом, релізинг-фактори якого вчасно не зменшували активність АКТГ і відповідно не врівноважили секрецію стероїдних гормонів [12, 14, 15]. З іншого боку, подібний приріст кортизолу в умовах стрес-тесту спрямований на підтримку артеріального тиску і хвилинного об'єму крові у молодих людей з низькими адаптаційними резервами, навіть за невеликих навантажень.

Серед хлопців і дівчат з недостатньою фізичною підготовкою або ознаками вегетативної дисфункції значний приріст показників кортизолу в умовах стрес-тесту також зумовлений зменшенням приросту тестостерону, чого не спостерігалося у групі молодих людей з високою толерантністю до фізичних навантажень, тобто в осіб без ознак гіподинамії.

Незважаючи на те, що рівень тестостерону у жінок приблизно у 8-10 разів нижчий від показників у чоловіків, його метаболічні ефекти проявляються далеко не в ослабленому вигляді. Зростання рівня тестостерону в умовах стрес-тесту створює оптимальні умови для покращання адаптаційних резервів організму і у хлопців, і у

дівчат [8]. Тому зниження рівня тестостерону у спокої та в умовах навантаження сприяє надмірному приросту кортизолу на висоті стрес-тесту, що супроводжується розладами адаптаційних механізмів під час фізичних навантажень в юнацькому віці.

Таким чином, визначення тестостерон-кортизолового співвідношення у слині на висоті фізичного навантаження можна використовувати як нейрогормональний маркер для оцінки стану функціональних резервів в юнацькому віці.

Перспектива подальших досліджень дозволить визначити зв'язок між активністю тестостерону і кортизолу у слині та показниками кардіореспіраторної системи в умовах фізичного навантаження.

Висновки

1. Визначення імуноферментним способом у слині тестостерон-кортизолового співвідношення в умовах фізичних навантажень можна використовувати як маркер стану функціональних резервів в юнацькому віці.

2. Вища толерантність до фізичних навантажень у тренуваних молодих людей частково пов'язана зі збалансованою реактивністю тестостерону і кортизолу в умовах стрес-тесту.

3. Гіподинамія та вегетативна дисфункція в юнацькому віці при зниженій толерантності до фізичних навантажень супроводжувалися порушеннями балансу між тестостероном і кортизолом на користь останнього.

4. Низький базальний рівень тестостерону у слині і його ослаблена реакція на фізичний стрес можуть свідчити про порушення механізмів нейрогормональної регуляції, дисметаболичні зміни в органах-мішенях, що дозволяє виявити імуноферментативна діагностика.

ЛІТЕРАТУРА

1. Streckfus C.F., Bigler L.R. Saliva as a diagnostic fluid // *Oral Dis.* 2002. — Vol. 8. — № 2. — P. 69-76.
2. Lewis J.G. Steroid Analysis in Saliva: An overview / J.G. Lewis // *Clin Biochem Rev.* — 2006. — Vol. 27, № 3. — P. 139-146.
3. Bouget M. Relationships among training stress, mood and dehydroepiandrosterone sulphate/cortisol ratio in female cyclists / M. Bouget, M. Rouveix, E. Filai-

re // *J. Sports Sci.* — 2006. — Vol. 24, № 12. — P. 1297-1302.

4. Crewther B.T. A comparison of ratio and allometric scaling methods for normalizing power and strength in elite rugby union players / B.T. Crewther, N. Gill, T. Lowe // *J. Sports Sci.* — 2009. — Vol. 27, № 14. — P. 1575-1580.

5. Гаркави Л.Х. Антистрессорные реакции и активационная терапия / Л.Х. Гаркави, Е.Б. Квакина, Т.С. Квакина. — М.: Имедис, 1998. — 654 с.

6. Рыбакина Е.Г. Клеточные и молекулярные механизмы взаимодействия иммунной и нейроэндокринной систем при синдроме хронической усталости в эксперименте / Е.Г. Рыбакина, С.Н. Шанин, Е.Е. Фомичева // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* — 2009. — Т. 95, № 12. — С. 1324-1335.

7. Busso T. Hormonal adaptations and modelled responses in elite weightlifters during 6 weeks of training / T. Busso, K. Hakkinen, A. Pakarinen // *European Journal of Applied Physiology.* — 1992. — № 64. — P. 381-386.

8. Жарінов О.Й. Навантажувальні проби у кардіології / О.Й. Жарінов, В.О. Куць, Н.В. Тхор. — К.: Медицина світу, 2006. — 89 с.

9. Moreira A. Salivary Cortisol in top-level professional soccer players / A. Moreira, F. Arsati, de Araujo // *Eur. J. Appl. Physiol.* — 2009. — Vol. 106, № 1. — P. 25-30.

10. Volek J.S. Testosterone and cortisol in relation to dietary nutrients and resistance exercise / J.S. Volek, W.J. Kraemer, J.A. Bush // *J. of Applied Physiology.* — 1992. — № 82. — P. 49-54.

11. Clow A.P. Post-awakening Cortisol secretion during basic military training / A. Clow, S. Edwards, A. Casey // *Int. J. Psychophysiol.* — 2006. — Vol. 60, № 1. — P. 88-94.

12. Іванюра І.О. Взаємозв'язок між нейродинамічними і вегетативними функціями організму учнів при адаптації до тривалих фізичних навантажень / І.О. Іванюра // *Укр. мед. альм.* — 2000. — Т. 3, № 1. — С. 64-67.

13. Окнин В.Ю. Проблема утомления, стресса и хронической усталости / В.Ю. Окнин // *Русский медицинский журнал.* — 2004. — Т. 12, № 5. — С. 46-50.

14. Lin H.Y. Molecular and structural basis of steroid hormone binding and release from corticosteroid-binding globulin /

H.Y. Lin, Y.A. Muller, G.L. Hammond // *Mol. Cell. Endocrinol.* — 2010. — Vol. 316, № 1. — P. 3-12.

15. Nater U.M. Stress-induced changes in human salivary alpha-amylase activity associations with adrenergic activity / U.M. Nater, R. La Marca, U. Ehlert // *Psychoneuroendocrinology.* — 2006. — Vol. 31, № 1. — P. 49-58.

REFERENCES

1. Streckfus C.F., Bigler L.R. *Oral Dis.* 2002 ; 8 (2) : 69-76.
2. Lewis J.G. *Clin Biochem Rev.* 2006 ; 27 (3) : 139-146.
3. Bouget M., Rouveix M., Michaux O., Pequignot J.M. and Filaire E.J. *Sports Sci.* 2006 ; 24 (12) : 1297-1302.
4. Crewther B.T., Gill N., Weatherby R.P., Lowe T.J. *Sports Sci.* 2009 ; 27 (14) : 1575-1580.
5. Garkavi L.Kh., Kvakina E.B., Kvakina T.S. Antistressornye reaktsii i aktivatsionnaia terapiia [Antistress Reactions and Activation Therapy]. Moscow : Imedis ; 1998 : 654 p. (in Russian).
6. Rybakina E.G., Shanin S.N., Fomicheva E.E. *Ros. fiziol. zhurn. im. I.M. Sechenova.* 2009 ; 95 (12) : 1324-1335 (in Russian).
7. Busso T., Hakkinen K., Pakarinen A., Kauhanen H., Komi P.V., Lacour J.R. *European Journal of Applied Physiology.* 1992 ; 64 : 381-386.
8. Zharinov O. Y., Kuts V.O., Tkhor N.V. Navantazhuvalni proby v kardiologii [Load Tests in Cardiology]. Kyiv : Meditsyna switu ; 2006 : 89 p. (in Ukrainian).
9. Moreira A., Arsati F., de Oliveira Lima Arsati Y.B., de Silva D.A., de Araujo V.C. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2009 ; 106 (1) : 25-30.
10. Volek J.S., Kraemer W.J., Bush J.A., Inledon T. and Boetes M. J. *J. of Applied Physiology.* 1992 ; 82 : 49-54.
11. Clow A.P., Edwards S., Owen G., Evans G., Evans P., Hucklebridge F., Casey A. *Int. J. Psychophysiol.* 2006 ; 60 (1) : 88-94.
12. Ivanyura I.O. *Ukr. med. almanakh.* 2000 ; 3 (1) : 64-67 (in Ukrainian).
13. Oknin V.Yu. *Russkii meditsinskii zhurnal.* 2004 ; 12 (5) : 46-50 (in Russian).
14. Lin H.Y., Muller Y.A., Hammond G.L. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2010 ; 316 (1) : 3-12.
15. Nater U.M., La Marca R., Florin L., Moses A., Langhans W., Koller M.M., Ehlert U. *Psychoneuroendocrinology.* 2006 ; 31 (1) : 49-58.

Надійшла до редакції 18.12.2014