

ISSN 0366-5119

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ  
НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ  
NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF ARMENIA



ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ  
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ  
BIOLOGICAL JOURNAL OF ARMENIA

2010

Լույս է տեսնում 1948 թվականից, հոդվածները հրատարակվում են հայերեն,  
ռուսերեն կամ անգլերեն լեզուներով  
Выходит с 1948 года, статьи публикуются на армянском, русском  
или английском языках  
Journal is published since 1948, the articles are published in Armenian,  
Russian or English

---

ԽՄԲԱԳՐԱԿԱՆ ԿՈԼԵԳԻԱ

Է.Ս. Գևորգյան (*գլխավոր խմբագիր*), Ռ.Մ. Հարությունյան (*գլխավոր խմբագրի տեղակալ*), Ա.Ս. Բոյաճյան (*գլխավոր խմբագրի տեղակալ*),  
Ա.Հ. Եսայան (*պատասխանատու քարտուղար*), Գ.Ա. Գևորգյան, Ա.Հ. Թոշունյան,  
Ռ.Հ. Հովհաննիսյան, Լ.Ռ. Մանվելյան, Ս.Խ. Մայրապետյան, Ժ.Հ. Վարդանյան.

ԽՄԲԱԳՐԱԿԱՆ ԽՈՐՀՈՒԴԴ

Յու.Թ. Ալեքսանյան, Ծ.Մ. Ավագյան, Է.Գ. Աֆրիկյան, Է.Ց. Գաբրիելյան,  
Ա.Ա. Գալոյան, Ս.Ա. Դավթյան, Ժ.Ի. Հակոբյան, Վ.Պ. Հակոբյան, Կ.Գ. Ղարաբյոկյան,  
Ս.Հ. Մովսիսյան, Կ.Ս. Պողոսյան, Գ.Հ. Փանոսյան, Լ.Լ. Օսիպյան.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Յ.Ս. Գևորգյան (*главный редактор*), Ր.Մ. Արությունյան (*заместитель главного редактора*), Ա.Ս. Բояджян (*заместитель главного редактора*),  
Ա.Գ. Եсаян (*ответственный секретарь*), Զ.Ա. Варданян, Գ.Ա. Գеворкян,  
Տ.Խ. Майрапетян, Л.Р. Манвелян, Р.О. Оганесян, А.А. Трчунян

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Ս.Մ. Ավակյան, Վ.Ս. Ակոպյան, Զ.Ի. Ակոպյան, Յ.Տ. Ալեքսանյան, Յ.Գ. Աֆրիկյան,  
Յ.Ս. Գաբրիելյան, Ա.Ա. Գալոյան, Մ.Ա. Դավթյան, Կ.Գ. Կարաբեյան, Ս.Օ. Մովսեսյան,  
Լ.Լ. Օսիպյան, Գ.Ա. Փանոսյան, Կ.Ս. Սոսոյան.

THE EDITORIAL BOARD

*Editor in chief:* E.S. Gevorgyan, *Vice-editors:* R.M. Aroutiunian, A.S. Boyadjyan,  
*Secretary-in-charge:* A.H. Yesayan, *Members of the Board:* G.A. Gevorgyan,  
R.H. Hovanesyan, L.R. Manvelyan, S.Kh. Mayrapetyan, A.H. Trchunyan,  
Zh.H. Vardanyan.

THE EDITORIAL COUNCIL

E.G. Afrikyan, Yu.T. Aleksanyan, Ts.M. Avakyan, M.A. Davtyan, E.Ts. Gabrielyan,  
A.A. Galoyan, V.P. Hakobyan, Zh.I. Hakobyan, K.G. Karagiozyan, S.H. Movsesyan,  
L.L. Osipyanyan, G.H. Panosyan, K.S. Poghosyan.

**ԲՈՎԱՆՆԱԿՈՒԹՅՈՒՆ**

**(Փորձարարական և տեսական հոդվածներ)**

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Հակոբյան Պ.Կ., Ղարաբեկյան Հ.Ա., Պողոսյան Ա.Հ., Շահինյան Ա.Ա. Էրիթրոցիտի պարզեցված թաղանթի հատվածի մոդելավորումը և դինամիկ ուսումնասիրությունը համակարգչային փորձի օգնությամբ.....                                                                                                                                                                                                                     | 6   |
| Գյուլխանդանյան Գ.Վ., Գյուլխանդանյան Ա.Գ., Գյուլխանդանյան Լ.Ժ., Ղազարյան Ռ.Կ., Մանյան Գ.Վ., Գևորգյան Է.Ս., Գևորգյան Գ.Ա. Որոշ կատիոնային պորֆիրինների կապումը շիճուկային պլումինի հետ.....                                                                                                                                                                                                             | 15  |
| Սարգիսով Գ.Թ., Սազայան Ռ.Շ., Կարապետյան Լ.Ս., Հակոբյան Ն.Է., Սարգսյան Ժ.Ս., Մաղաթովա Ի.Ռ. Մկների վարքագծի անհատական առանձնահատկությունները «սև-սպիտակ խցիկի» թեստում.....                                                                                                                                                                                                                             | 23  |
| Արժրունի Ի.Բ., Մատինյան Կ.Ս., Դեմիրխանյան Լ.Հ., Մելնիկովա-Շառովա Մ.Ա., Մարգարյան Ա.Վ., Մարգարյան Է.Գ., Գևորգյան Է.Ս. ՊԱՌՊ-1 ֆերմենտի ակտիվության փոփոխությունը առնետի լյարդի բջիջների՝ թիմոցիտների կորիզներում ցիսպլատինի <i>in vivo</i> ազդեցության դեպքում.....                                                                                                                                     | 30  |
| Թաթևկյան Ս.Շ., Մկրտչյան Ն.Ի., Սիմոնյան Ն.Վ., Խաչատրյան Գ.Է. Եռագիծային հերթիցիդների կենսաբանական քայքայումը.....                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 36  |
| Մամբրեկյան Հ.Ն. <i>Rosa haemisphaerica</i> կիսագնդաձև մասրենու պտուղները որպես վերամշակության հումք.....                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 43  |
| Նահապետյան Խ.Հ., Հարությունյան Ռ.Ա., Բաբախանյան Մ.Ա., Հովհաննիսյան Լ.Է. Նուրբեկյան Լ.Վ., Մարչենկո Ջ.Բ. Կիտրոնային ռենանի ( <i>Osimum Basilicum</i> L.) ազդեցությունը առնետների օրգանիզմի ջերմային հոմեոստազի կարգավորման վրա.....                                                                                                                                                                     | 47  |
| Ջախարյան Ռ. Կոմպլեմենտի համակարգի C1q սպիտակուցի եզակի նուկլեոտիդային պոլիմորֆիզմները շիճաֆրենիայի ժամանակ.....                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 51  |
| Հովհաննիսյան Հ.Ա., Ներսիսյան Գ.Ս. Բույսերի ազոտի նյութափոխանակության առանձնահատկությունների ուսումնասիրությունը Երևան քաղաքի պայմաններում.....                                                                                                                                                                                                                                                        | 57  |
| Հովակիմյան Ս.Ս. Թերապևտիկ բարձր արդյունավետությամբ օժտված կոմարինային բնույթի սինթետիկ միացության հակամակարդիչ ազդեցության առանձնահատկությունները.....                                                                                                                                                                                                                                                | 62  |
| Նաղաշյան Հ.Զ., Շչերբակով Օ.Վ. Հողային անողնաշարավորները որպես գյուղատնտեսական կենդանիների մակաբույծ որդերի միջանկյալ տերերը Հայաստանում.....                                                                                                                                                                                                                                                          | 68  |
| Կարապետյան Ի.Ռ., Թոփուզյան Վ.Օ., Խաչատրյան Տ.Ս., Հարությունյան Է.Յու., Կիպրիյան Տ.Կ. Յոդմեթիլատ 2-(դիմեթիլամինո) էթիլ էթեր N((Պ(մեթոքսիբենզոիլ)(DL(ֆենիլլալանինի և յոդմեթիլատ 2(դիմեթիլա մինո) էթիլ էթեր N(բենզոիլ(DL(վալինի համակցված ազդեցության ուսումնասիրումը ողնուղեղի առանձին ինտերնեյրոնների և մոտոնեյրոնների արտաբջջային ֆոնային էլեկտրական ակտիվության վրա լատերալ կիսահատման ժամանակ ..... | 72  |
| Հունանյան Լ.Ս., Սոցկի Օ.Պ., Խաչատրյան Լ.Գ., Շիրինյան Է.Ա., Մելքոնյան Մ.Մ., Աղվուկի և Ա- ադրենուրիկատորների ազդեցության պայմաններում սպիտակ առնետների արյան շիճուկում սպիտակուցների օքսիդացման մոդիֆիկացիաները.....                                                                                                                                                                                    | 79  |
| Առաքելյան Վ.Բ., Էլիզբարյան Մ.Ա., Վարդանյան Պ.Հ. ԴՆԹ-ի հետ երկայնաձիգ լիզանդների կապման երկփուլ կինետիկան.....                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 84  |
| Գևորգյան Գ.Ա., Դանիելյան Ա.Ա., Գրիգորյան Կ.Վ. Սյունիքի մարզում մարդու կենցաղային գործունեության հետևանքով շրջակա միջավայր ներմուծվող կենսաձին տարրերի քանակական բնութագիրը.....                                                                                                                                                                                                                       | 89  |
| Վարդանյան Ժ.Հ., Բաղայան Վ.Լ., Հովսեփյան Ռ.Ա. Հատապտղային կենին ( <i>Taxus baccata</i> L.) Դեբեղ գետի ավազանում.....                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 93  |
| Առաքելյան Ա.Վ. Փոքր հազեցումների դեպքում ԴՆԹ-ի վրա տարբեր տիպի լիզանդների համատեղ ազդեցության կորը .....                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 98  |
| Աբրահամյան Վ.Վ., Աբովյան Ա.Յու., Խաչատրյան Ն.Է. Բակային սպանդի սանիտարական և տնտեսական վնասը .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 102 |
| Վաստակավոր գիտնականը և մանկավարժը (ՀՀ ԳԱԱ ակադեմիկոս Լ.Լ. Օսիպյանի ծննդյան 80 ամյակի առթիվ).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 104 |
| Գիտությանը ամենացուրտ նվիրված կյանք (ՀՀ ԳԱԱ ակադեմիկոս Մ.Ա. Դավթյանի ծննդյան 75 ամյակի առթիվ) .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 106 |

## СОДЕРЖАНИЕ

## •Экспериментальные и теоретические статьи•

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <i>Акопян П.К., Гарабекян Г.А., Погосян А.Г., Шагинян А.А.</i> Моделирование и динамическое исследование фрагмента упрощенной мембраны эритроцита при помощи компьютерного эксперимента.....                                                                                                                                                                                                                                              | 6   |
| <i>Гюльханданян Г.В., Гюльханданян А.Г., Гюльханданян, Л.Ж. Казарян, Амелян Г.В., Геворкян Э.С., Геворкян Г.А.</i> Связывание некоторых катионных порфиринов с сывороточным альбумином..                                                                                                                                                                                                                                                  | 15  |
| <i>Саркисов Г.Т., Саркисян Р.Ш, Карапетян Л.М., Акопян Н.Э, Саркисян Ж.С., Мадатова И.Р.</i> Индивидуальные особенности поведения мышей в тесте “черно-белая камера” .....                                                                                                                                                                                                                                                                | 23  |
| <i>Арицруни И.Г., Матинян К.С., Демирханян Л.О., Мельникова-Шарова М.А., Маргарян А.В., Саркисян Э.Г., Геворкян Э.С.</i> Изменение активности ПАРП-1 в ядрах клеток печени и тимоцитов крыс при <i>in vivo</i> воздействии цисплатина.....                                                                                                                                                                                                | 30  |
| <i>Татикян С.Ш., Мкртчян Н.И., Симонян Н.В., Хачатрян Г.Э.</i> Биодegradация триазиновых гербицидов.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 36  |
| <i>Амирбекян А.Н.</i> Плоды шиповника полушаровидного ( <i>Rosa haemisphaerica</i> ) как сырье для переработки.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 43  |
| <i>Нагапетян Х.О., Арутюнян Р.А., Бабаханян М.А., Оганесян Л.Э., Нурбекян Л.В.</i> Влияние базилика лимонного ( <i>Ocimum Basilicum</i> L) на регуляцию температурного гомеостаза организма крыс.....                                                                                                                                                                                                                                     | 47  |
| <i>Захарьян Р.</i> Единичные нуклеотидные полиморфизмы C1q белка системы комплемента при шизофрении.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 51  |
| <i>Оганесян А.А., Нерсисян Г.С.</i> Изучение особенностей азотного обмена растений в условиях города Еревана.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 57  |
| <i>Овакимян С.С.</i> Особенности антикоагулянтного действия синтетического соединения кумариновой природы с высокой степенью терапевтической эффективности.....                                                                                                                                                                                                                                                                           | 62  |
| <i>Нагащян О.З., Щербakov О.В.</i> Почвенные беспозвоночные как промежуточные хозяева гельминтов сельскохозяйственных животных в Армении .....                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 68  |
| <i>Карапетян И.Р., Топузян В.О., Хачатрян Т.С., Арутюнян Э.Ю., [Киприян Т.К.]</i> Исследование сочетанного действия йодметилата 2 –(диметиламино) этилового эфира – N – (П – метокси-бензоил) – DL – фенилаланина и йодметилата 2 – (диметиламино) этилового эфира N – бензоил – DL – валина на внесклеточную фоновую электрическую активность одиночных интернейронов и мотонейронов спинного мозга крыс при латеральной гемисекции..... | 72  |
| <i>Унанян Л.С., Соцкий О.П., Хачатрян Л.Г., Ширинян Э.А, Мелконян М.М.</i> Окислительная модификация белков сыворотки крови белых крыс под влиянием шума и $\alpha_2$ -адреноблокаторов. ....                                                                                                                                                                                                                                             | 79  |
| <i>Аракелян В.Б., Элизбарян М.А., Вардеванян П.О.</i> Двухстадийная кинетика адсорбции протяженных лигандов на ДНК.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 84  |
| <i>Геворкян Г.А., Даниелян А.А., Григорян К.В.</i> Количественная характеристика биогенных элементов, вносимых в окружающую среду в результате человеческой деятельности в марзе Сюник.....                                                                                                                                                                                                                                               | 89  |
| <i>Варданян Ж.А., Бадалян В.Л., Овсепян Р.А.</i> Тисс ягодный ( <i>Taxus baccata</i> L.) в бассейне реки Дебед.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 93  |
| <i>Аракелян А.В.</i> Изотерма совместной адсорбции различных типов лигандов на ДНК при малых заполнениях.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 98  |
| <i>Абрамян В.В., Абовян А.Ю., Хачатрян Н. Э.</i> Экономический и санитарный ущерб, нанесенный при дворовом убое скота.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 102 |
| <i>Заслуженный ученый и педагог (К 80-летию со дня рождения академика НАН РА Л.Л. Осипян) .....</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 104 |
| <i>Жизнь, всецело посвященная науке (К 75-летию со дня рождения академика НАН РА М.А. Давтяна) .....</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 106 |

# CONTENTS

## •Experimental and Theoretical articles•

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <i>Hakobyan P.K., Gharabekyan H.A., Poghosyan A.H., Shahinyan A.A.</i> Dynamic research and simulation of the human erythrocyte membrane fragment by computer experiment.....                                                                                                                                                                                                                                               | 6   |
| <i>Gyulkhandanyan G.V., Gyulkhandanyan A.G., Gyulkhandanyan L.Zh., Ghazaryan R.K., Amelyan G.V., Gevorgyan E.S., Kevorkian G.A.</i> Binding of some cationic porphyrins with serum albumin.....                                                                                                                                                                                                                             | 15  |
| <i>Sargisov G.T., Sargsyan R.Sh., Karapetyan L.M., Hakobyan N.E., Sargsyan J.S., Madatova I.R.</i> The individual differences in the behaviour of mice in the test of “light-dark box”.....                                                                                                                                                                                                                                 | 23  |
| <i>Artsruni I.G., Matinyan K.S., Demirkhanyan L.H., Melnikova-Sharova M.A., Margaryan A.V., Sargsyan E.G., Gevorgyan E.S.</i> Changes in PARP-1 activity in rat liver and thymocyte nuclei after in vivo administration of cisplatin.....                                                                                                                                                                                   | 30  |
| <i>Tatikyan S.Sh., Mkrtchyan N.I., Simonyan N.V., Khachatryan G.E.</i> Biodegradation of triazine herbicides....                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 36  |
| <i>Amirbekyan H.</i> Fruits of <i>Rosa haemispheerica</i> as raw material for foodprocessing.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 43  |
| <i>Nahapetyan Ch.H., Harutyunyan R.A., Babachanyan M.A., Hovhannisyan L.E., Nurbekyan L.V., Marchenko Z.I.</i> The influence on lemon basilica ( <i>Ocimum Basilikum</i> L.) on regulation of temperature homeostasis of rat organism.....                                                                                                                                                                                  | 47  |
| <i>Zakharyan R.</i> Single nucleotide polymorphisms of the complement system C1Q protein in schizophrenia.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 51  |
| <i>Hovhannisyan H.A., Nersisyan G.S.</i> Studying peculiarities of nitric metabolism in plants under conditions of Yerevan city .....                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 57  |
| <i>Hovakimyan S.S.</i> Peculiarities of anticoagulant action of the synthetic compound of cumarin nature by the high level of therapeutic effectiveness .....                                                                                                                                                                                                                                                               | 62  |
| <i>Naghashyan H.Z., Shcherbakov O.V.</i> Soil invertebrates as intermediate hosts of farm animal helminthes in Armenia.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 68  |
| <i>Karapetyan I.R., Topuzyan V.O., Khachatryan T.S., Haroutiunyan E.Yu., Kipriyan T.K.</i> Investigation of combined action of iodmethyle 2 – (dlimethylamino) ethyl N – (P - metoxybenzoi) – DL – fenilalanyn ester and iodmethyle 2 – (dimethylamino) ethyl N – benzoi – DL – valin on extracellular background electrical activity of spinal cord single interneurons and motoneurons after its lateral hemisection..... | 72  |
| <i>Unanyan L.S., Sotski O.P., Khachatryan L.G., Shirinyan E.A., Melqonyan M.M.</i> The oxidative modification of white rats serum proteins under the noise and $\alpha_2$ – adrenoblockers influence.....                                                                                                                                                                                                                   | 79  |
| <i>Arakelyan V.B., Elizbaryan M.A., Vardevanyan P.O.</i> Two-phases kinetics of adsorptions of extended ligands on DNA.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 84  |
| <i>Gevorkyan G.A., Danielyan A.A., Grigoryan K.V.</i> Quantitative characteristics of biogenic elements entered into the environment as a result of anthropogenic living activities in Syunik marz (region).....                                                                                                                                                                                                            | 89  |
| <i>Vardanyan J.H., Badalyan V.L., Hovsepyan R.A.</i> ( <i>Taxus baccata</i> L.) in Debed river basin.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 93  |
| <i>Arakelyan A.V.</i> Izoterm of joint adsorption of different types of ligands on DNA at small fillings.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 98  |
| <i>Abrahamyan V.V., Abovyan A.Y., Khachatryan N.E.</i> Economic and sanitary damage of yard cattle slaughter.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 102 |
| Distinguished scientist and pedagogue (to 80-year of academician of NAS RA L.L. Osipyan’s birthday).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 104 |
| Life, entirely devoted to science (to 75-year of academician of NAS RA M.A. Davtyan’s birthday) .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 106 |



Биол. журн. Армении, 1 (62), 2010

## МОДЕЛИРОВАНИЕ И ДИНАМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФРАГМЕНТА УПРОЩЕННОЙ МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТА ПРИ ПОМОЩИ КОМПЬЮТЕРНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА

Ս.Կ. ԱԿՈՅԱՆ, Գ.Ա. ԳԱՐԱԲԵԿՅԱՆ, Ա.Գ. ՍՈԳՍՅԱՆ,  
Ա.Ա. ՇԱԳԻՆՅԱՆ

*Международный научно-образовательный центр НАН РА*

Исследовали динамическую структуру фрагмента мембраны эритроцита человека с помощью компьютерного эксперимента, а также такие важные свойства мембраны, как латеральная диффузия молекул фосфолипидов и белка гликофорина А в мембране, распределение различных фосфолипидов и динамические изменения конформации углеводородных цепочек фосфолипидных молекул.

*Мембрана эритроцита человека - латеральная диффузия -  
фосфолипидная мембрана*

Համակարգչային փորձի օգնությամբ հետազոտվել է մարդու էրիթրոցիտի թաղանթի հատվածի դինամիկ կառուցվածքը և որոշ կարևոր հատկություններ, այդ թվում ֆոսֆոլիպիդային մոլեկուլների լատերալ դիֆուզիայի օրինաչափությունները, գլիկոֆորին Ա թաղանթային սպիտակուցի վարքը ֆոսֆոլիպիդների բաշխվածությունը, ինչպես նաև ֆոսֆոլիպիդային մոլեկուլների ածխաջրածնային շղթաների դինամիկ վարքը թաղանթի ներսում և այլն:

*Մարդու էրիթրոցիտի թաղանթ - լատերալ դիֆուզիա -  
ֆոսֆոլիպիդային թաղանթ*

The dynamic structure of a fragment of human erythrocyte membrane was investigated through the computer experiment. Some important properties including mechanisms of the lateral diffusion of phospholipids molecules, behaviour of Glycophorin A protein molecules, distribution of different phospholipids and dynamic behavior of hydrocarbon chains of phospholipid molecules within the membrane were examined.

*Human erythrocyte membrane - lateral diffusion -  
phospholipid bilayer*

В последнее время применение компьютерного эксперимента в научно-исследовательских работах приобретает все большее и большее распространение. Его возникновение, в первую очередь, связано с высоким развитием информационных технологий: созданием высокопроизводительных вычислительных комплексов и новейших инструментов вычисления, а также с резким ростом расходов при физических экспериментах. Компьютерный эксперимент представляет собой симбиоз физического эксперимента и теории. С одной стороны, цифровая модель системы строится по данным физического эксперимента, с другой – само исследование проводится при помощи воздействия силовых полей, описываемых формулами, на систему.

Учеными показано, что методы и возможности информационных технологий можно эффективно использовать и для исследования молекулярной структуры и свойств сложных многокомпонентных биологических и химических систем в динамике [1-3]. Возникают совершенно новые перспективные области применения вычислительных методов, которые позволяют рассматривать более комплексные и близкие к реальности системы модели. Уже созданы и развиваются специализированные алгоритмы и инструменты расчета, наиболее распространенным из которых является метод "молекулярной динамики" [4].

В настоящей работе методом компьютерного эксперимента исследована структура мембраны эритроцита человека и ламеллярной жидкокристаллической фазы некоторых поверхностно-активных веществ (ПАВ).

### МЕТОДЫ МОДЕЛИРОВАНИЯ И КОМПЬЮТЕРНЫЙ ЭКСПЕРИМЕНТ

Компьютерные эксперименты были проведены на высокопроизводительном *Армкластере* НАН РА. На данный момент *Армкластер* является самой мощной высокопроизводительной системой на Кавказе, с пиковой производительностью 783.36 Гигафлоп и 2Гб оперативной памяти на каждом узле. Узлы объединены в сеть при помощи высокоскоростной сети Myrinet (2Гбит/с). Кластер работает под ОС Linux RedHat 9.0 с поддержкой SMP. Для визуализации молекулярной динамики использован пакет *VMD: Visual Molecular Dynamics*.

Ниже представлены параметры моделирования.

- Использованные ноды /процессоры : 25/50
- Тип процессора: Intel Xeon 3.06GHz
- Тип связи: Myrinet
- Программное обеспечение: Gromacs, NAMD 2.5, MDesigner
- Силовые поля: CHARMM all27
- Температура и давление в эксперименте 320K и 1атм  
(Langevin and Nose-Hoover Langevin piston methods)
- Модель воды TIP3
- Биологическое время моделирования: 60-100 нсек.
- Химическое время моделирования: 20-230 нсек.
- Время, требуемое для экспериментов на одном компьютере: 10 лет
- Время экспериментов на Армкластере: 3 месяца.
- Временной шаг интегрирования: 2 фемто сек.

В качестве основного метода моделирования был использован метод «молекулярной динамики» (МД), который позволяет моделировать детальную микроскопическую картину внутренних движений молекул (или макромолекул) и успешно используется в теоретических исследованиях структуры и динамики биологических макромолекул, жидкостей, газов и других сложных молекулярных систем. Методом МД рассчитываются классические (ньютоновские) траектории движения атомов молекулы в силовом поле эмпирического атом-атомного потенциала, т.е. моделируется детальная микроскопическая картина внутреннего теплового движения макромолекулы в субнаносекундных интервалах времени. Основу метода составляет численное решение классических уравнений Ньютона для системы взаимодействующих частиц:

$$m_i \frac{d^2 \mathbf{r}_i(t)}{dt^2} = \mathbf{F}_i(\mathbf{r}), i = 1, 2, \dots, n, \quad (1)$$

где  $\mathbf{r}_i$  - радиус-вектор  $i$ -го атома,  $m_i$  - его масса,  $\mathbf{F}_i$  - суммарная сила, действующая на  $i$ -й атом со стороны остальных частиц;

$$\mathbf{F}_i(\mathbf{r}) = -\frac{\partial U(\mathbf{r})}{\partial \mathbf{r}_i}. \quad (2)$$

Здесь  $\mathbf{r} = \{\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_n\}$ , а  $U(\mathbf{r})$  - потенциальная энергия, зависящая от взаимного расположения всех атомов;  $n$  - число атомов.

Задав координаты и скорости всех атомов в начальный момент времени, численно решают уравнения движения, вычисляя на каждом шагу все силы, новые координаты и скорости частиц. Температура определяется как средняя кинетическая энергия, приходящаяся на одну степень свободы системы:

$$T(t) = \frac{1}{3Nk_B} \sum_{i=1}^n m_i v_i^2, \quad (3)$$

$$\mathbf{v}_i = \frac{d\mathbf{r}_i}{dt}. \quad (4)$$

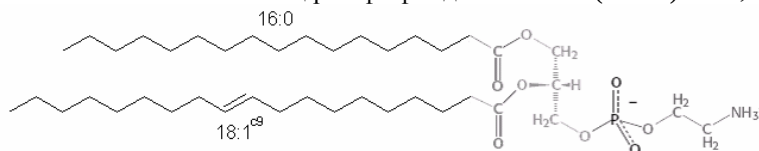
Здесь  $N$  - полное число степеней свободы молекулы,  $k_B$  - постоянная Больцмана. В случае изолированной системы  $N=3n-6$ , поскольку сохраняется ее полный импульс и момент импульса. Кроме того, в этом случае сохраняется полная энергия системы, а температура получается усреднением ее мгновенных значений  $T(t)$  по некоторому интервалу времени.

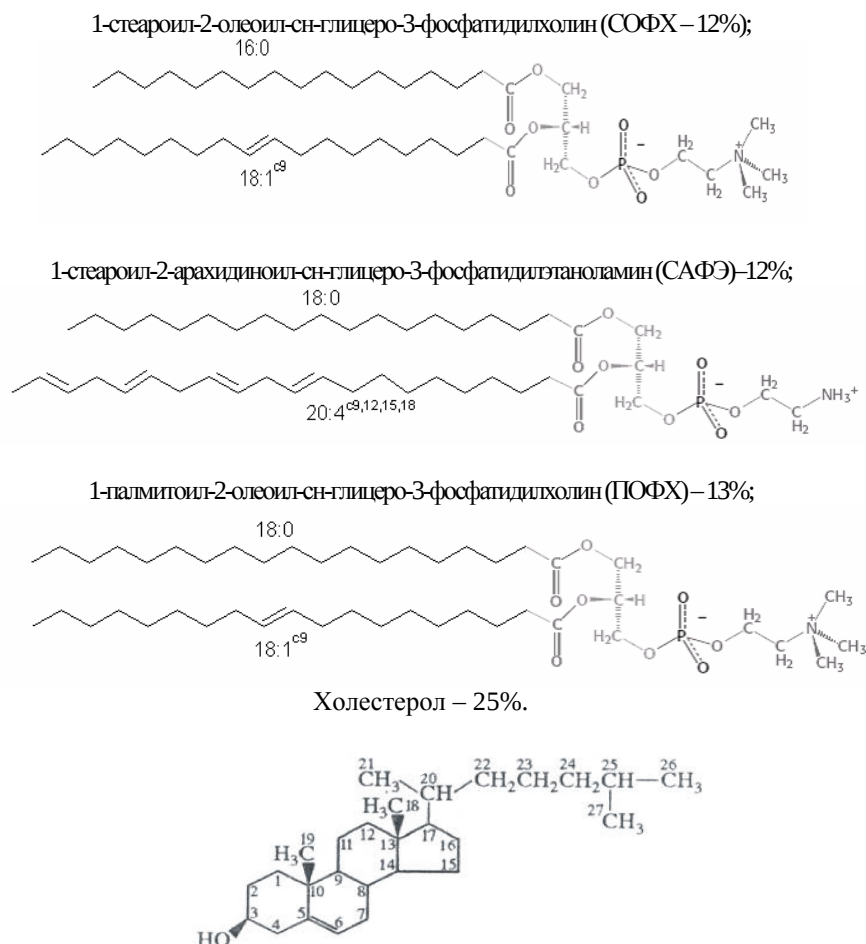
Для моделирования методом МД нами использованы следующие файлы: файл координат атомов системы и файл топологий молекул модели, в котором содержатся параметры всех ковалентных связей, валентных и торсионных углов и т.д. атомов системы. За основу были взяты типовые топологии фосфолипидных молекул с полярными головками фосфатидилэтаноламина и фосфатидилхолина, содержащиеся в стандартном файле топологии `top_all27_prot_lipid`. Эти данные имеются в последней версии силовых полей CHARMM27 [5], а для манипуляций с атомами использовалась программа VMD. Был написан скрипт на макроязыке TCL, который в автоматическом режиме создает стартовый фосфолипидный бислой, или мицеллу ПАВ, случайным образом вращая молекулы фосфолипидов или ПАВ вокруг своих осей, помещая каждую молекулу в прямоугольные ячейки, после чего эти ячейки случайным образом распределяются в массиве размером 64x2 в случае мембраны и 256x2 в случае мицелл. Для симуляции мембран эритроцита был проведен сравнительный анализ [6] известных пакетов Gromacs и NAMD, на основании которого было выбрано программное обеспечение для наших исследований. Для проведения компьютерного эксперимента на биологических мембранах был разработан также специальный пакет программ Mdesigner [7]. При моделировании использованы 5 типов фосфолипидов, имеющихся в мембране эритроцита человека [8].

В фосфолипидную мембрану ввели также важный функциональный белок, характерный для эритроцита: гликофорин А.

В качестве ПАВ использованы додецилсульфат натрия- $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4\text{Na}$  и пентадецилсульфонат натрия –  $\text{C}_{15}\text{H}_{31}\text{SO}_3\text{Na}$ , промышленной марки E-30 и K-30.

1-пальмитоил-2-олеоил-сн-глицеро-3-фосфатидилэтаноламин (ПОФЭ) – 10%;





## РЕЗУЛЬТАТЫ КОМПЬЮТЕРНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА

**Мембрана эритроцита.** На рис.1 представлена модель равновесного фосфолипидного бислоя мембраны эритроцита человека в присутствии воды, полученная компьютерным экспериментом при помощи минимизации свободной энергии системы. Анализ данных, представленных на рис.1б, показывает, что в мембране разные типы фосфолипидов не смешиваются.

Таким образом, из данных компьютерного эксперимента можно сделать предположение, что в мембране эритроцита должны существовать домены отдельных фосфолипидов.

Если это предположение верно, то оно должно сказаться на процесс диффузии фосфолипидных молекул в мембране. С этой целью была исследована латеральная диффузия молекул всех типов фосфолипидов в модельной мембране эритроцита.

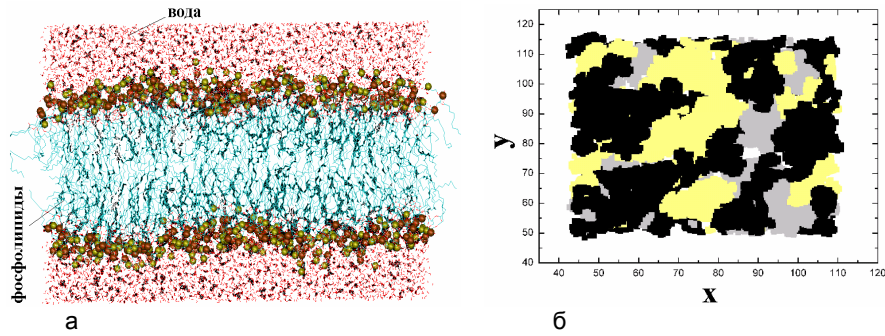
Для определения коэффициента латеральной диффузии (проекция диффузии молекул фосфолипидов в плоскости x-y) воспользовались формулой, описывающей зависимость среднеквадратичного отклонения центра тяжести отдельных типов фосфолипидов (MSD) от времени:

$$MSD = \sum_{all} \langle |\vec{r}(t) - \vec{r}(0)|^2 \rangle,$$

где  $\vec{r}(0)$  и  $\vec{r}(t)$  радиус – векторы центра тяжести молекул в начале процесса диффузии и в момент  $t$ .

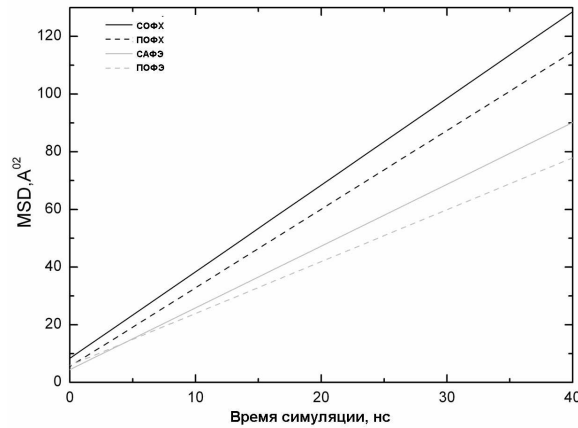
При этом зависимости MSD для отдельных фосфолипидов от времени симуляции ( $t$ ) описываются формулой:

$$D_{lat} = MSD / 4 \cdot t.$$



**Рис. 1.** Равновесная модель фосфолипидного бислоя (а) при соотношении фосфолипидов: 12% ПОФХ / 13% СОФХ / 12% САФЭ / 10% ПОФЭ/25%ХОЛ. Распределение фосфолипидов в мембране (б). Проекция на плоскость x-y.

На рис. 2 представлены зависимости MSD от времени симуляции для отдельных фосфолипидов при латеральной диффузии их молекул в мембране, полученные компьютерным экспериментом.



**Рис. 2.** Зависимость MSD от времени симуляции для фосфолипидов: СОФХ, ПОФХ, САФЭ и ПАФЭ в мембране эритроцита.

Значения коэффициентов латеральной диффузии отдельных фосфолипидов в мембране эритроцита представлены в табл.1.

В настоящее время методы физического эксперимента позволяют измерять коэффициенты латеральной диффузии только для искусственных бимолекулярных слоев, состоящих из одного типа фосфолипида [9,10].

Сравнивая значения коэффициентов латеральной диффузии для бислоев отдельных фосфолипидов и мембраны эритроцита, содержащей все эти фосфолипиды, обнаруживаем совпадение. Такое совпадение коэффициентов латеральной диффузии может быть только в том случае, если отдельные фосфолипиды в мембране имеют свои собственные ареалы существования, как это представлено на рис.16.

**Таблица 1.** Коэффициенты латеральной диффузии для разных фосфолипидов в мембране.

| Фосфолипиды                              | СОФХ                 | ПОФХ                 | САФЭ                 | ПОФЭ                 |
|------------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Коэффициент диффузии, см <sup>2</sup> /с | $4,2 \times 10^{-8}$ | $3,7 \times 10^{-8}$ | $2,9 \times 10^{-8}$ | $2,6 \times 10^{-8}$ |

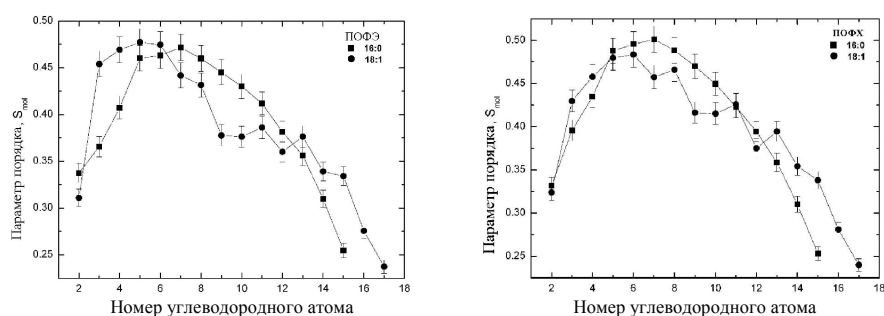
В динамике при моделировании до 100 нсек видно, что все компоненты фосфолипидной мембраны находятся в состоянии непрерывного теплового движения. При этом интенсивным конформационным изменениям подвергаются углеводородные цепочки молекул фосфолипидов внутри мембраны. Для изучения усредненной картины конформационных изменений углеводородных цепочек молекул отдельных фосфолипидов в мембране методом компьютерного эксперимента было исследовано изменение параметра ориентационного порядка углеводородных цепочек молекул:

$$S_{mol} = \left\langle \frac{3}{4} \cos^2 \theta_i \right\rangle - \frac{1}{4},$$

где  $\theta_i$  - угол между осью молекулы и нормали к поверхности мембраны.

Скобки обозначают ансамбль и усреднение во времени. Из приведенной формулы видно, что если углеводородная цепочка или ее фрагмент расположены параллельно к нормали поверхности бислоя, то  $S_{mol} = 0,5$ , а если перпендикулярно, то  $S_{mol} = 0,25$ .

На рис.3 в качестве примера показаны изменения степени ориентации углеводородных цепочек молекул ПОФХ и ПОФЭ по мере углубления в гидрофобный объем бислоя.



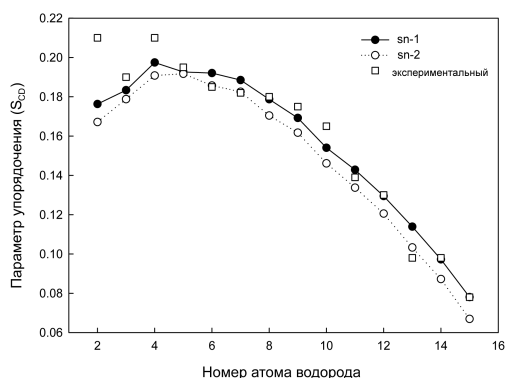
**Рис. 3.** Зависимость параметра ориентационного порядка углеводородных цепочек молекул фосфатидилхолина - ПОФХ (а) и фосфатидилэтаноламина – ПОФЭ (б) от глубины погружения в мембрану.

Как видно из рисунков, участки углеводородных цепочек молекул фосфолипидов, расположенных ближе к поверхности бислоя (к глицерольной группе), ориентируются приблизительно перпендикулярно к нормали. Это обусловлено, вероятно, тем, что глицерольная группа расположена перпендикулярно к нормали поверхности бислоя. По мере удаления от глицерольной группы вглубь бислоя, углеводородные цепочки становятся конформационно более свободными и начина-

ют ориентироваться преимущественно параллельно к нормали поверхности бислоя. При дальнейшем удалении от полярной группы молекул фосфолипида из-за увеличения степени свободы движения углеводородных цепочек их ориентационный порядок начинает уменьшаться, стремясь к полной дезориентации.

Ориентационный порядок экспериментально был исследован для фосфолипидных бислоев, состоящих из одного типа фосфолипида [11].

Как видно из рис. 4, данные, полученные методом ЯМР спектроскопии и компьютерным экспериментом для дипальмитоил-фосфатидилхолина, хорошо согласуются.

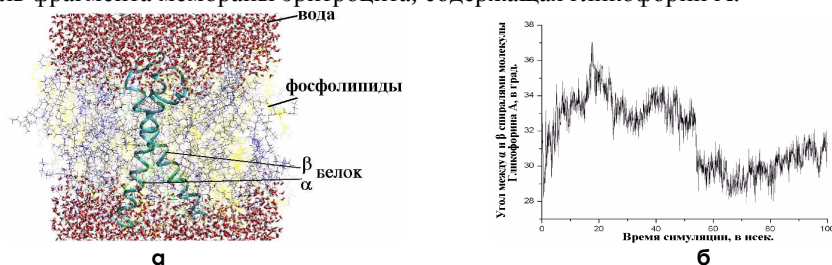


**Рис. 4.** Ориентационные параметры порядка углеводородных цепочек молекул дипальмитоилфосфатидилхолина, полученные физическим экспериментом и моделированием.

Таким образом, в тех случаях, когда можно поставить физический эксперимент, результаты физического и компьютерного экспериментов достаточно хорошо совпадают.

Известно, что одним из наиболее изученных из мембранных белков эритроцита является гликофорин А, представляющий собой гликопротеид, пронизывающий фосфолипидные слои мембраны и выступающий наружу. Гликофорин образует устойчивый димер не только в природных системах, но и в искусственных липидных средах, таких как мицеллы додецилфосфатидилхолина. Для этого белка найдена пространственная структура димера методом ЯМР-спектроскопии [12, 13].

Модель фрагмента мембраны эритроцита нами была построена при помощи внедрения мембранного белка эритроцита гликофорина А в равновесный гидратированный фосфолипидный бислой. На рис.5а представлена равновесная модель фрагмента мембраны эритроцита, содержащая гликофорин А.



**Рис. 5** Равновесная модель фрагмента мембраны эритроцита (а).  
Угол между  $\alpha$ ,  $\beta$  спиральями молекулы гликофорина А (б).

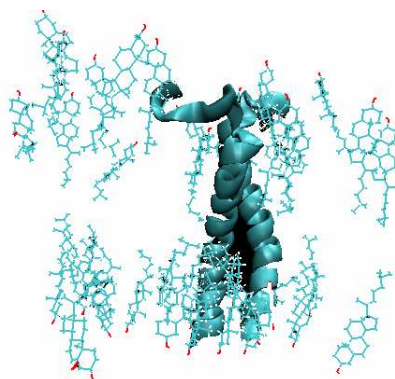
Рассмотрим динамику поведения  $\alpha$  и  $\beta$  – субъединиц гликофорина А в мембране. На рис. 5б представлена зависимость угла наклона между  $\alpha$  и  $\beta$  – субъединицами белка внутри мембраны.

Имеются работы, где методами ЯМР-спектроскопии и динамического моделирования изучено влияние структуры молекул фосфолипида на конформацию гликофорина А для искусственной мембраны, состоящей из одного типа фосфолипида [13]. Исследована зависимость конформации гликофорина от длины и степени насыщенности углеводородных цепей фосфолипидов, окружающих гликофорин. С помощью МД и ЯМР установлено, что с увеличением количества  $\text{CH}_2$  групп и двойных связей углеводородных цепей фосфолипидов увеличивается угол между спиралями димера гликофорина. Показано, что при увеличении числа  $\text{CH}_2$  групп в углеводородных цепочках молекул фосфолипида с 14 до 18 угол между спиралями в среднем достигает величины  $11^\circ$ . В нашем случае, где вместо гомогенной фосфолипидной мембраны исследуется гетерогенная мембрана с молекулами фосфолипидов, имеющих углеводородные цепочки с числом  $\text{CH}_2$  групп от 16 до 20, в среднем угол имеет значение порядка  $30^\circ$ . По всей вероятности, увеличение угла связано с доминированием гидрофобности в окружении белка.

Большой интерес представляет взаимодействие холестерина с гликофорин-ом А и влиянием белка на динамику поведения молекул воды в мембране.

На рис. 6 представлен белок гликофорин А в окружении молекул холестерина в мембране эритроцита. Как видно из рис., в мембране эритроцита молекулы холестерина взаимодействуют с молекулой гликофорина А и окружают ее.

Важной проблемой является проникновение молекул воды в мембрану. Компьютерный эксперимент показывает отсутствие молекул воды в гидрофобной части мембраны в отсутствие белка и проникновение в мембрану в присутствии гликофорина А.

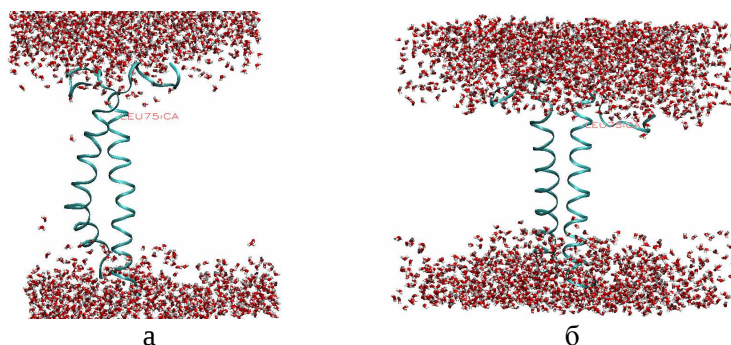


**Рис. 6.** Белок в окружении холестерина. Молекулы остальных фосфолипидов и воды на рисунке не показаны

На рис. 7 показано стартовое состояние системы вода-гликофорин А в начале компьютерного эксперимента и после 100 нсек моделирования. Молекулы фосфолипидов на рисунке не показаны.

Как видно из рисунка, в непосредственной близости молекулы белка имеет место проникновение молекул воды в мембрану, что, вероятно, обусловлено асимметричной структурой белка.

Таким образом, показана возможность применения компьютерного эксперимента для исследования сложных биологических мембран.



**Рис. 7.** Стартовое состояние мембраны эритроцита (а) и после 100 нсек. симуляции. Молекулы фосфолипидов на рисунке не показаны.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Tieleman, D.P. and H.J.C. Berendsen. Molecular dynamics simulations of a fully hydrated dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer with different macroscopic boundary conditions and parameters. *J. Chem. Phys.* 105, 4871–4880, 1996.
2. K. Tu, D.J. Tobias & M.L. Klein. Constant pressure and temperature molecular dynamics simulation of a fully hydrated liquid crystal phase dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer. *Biophys. J.*, 69, 2558-2562, 1995.
3. S.W. Chiu, M. Clark, V. Balaji, S. Subramaniam, L.H. Scott & E. Jakobsson. Incorporation of surface tension into molecular dynamics simulation of an interface: a fluid phase lipid bilayer membrane. *Biophys. J.* 69, 1230-1245, 1995.
4. E. Lindahl, B. Hess & D. van der Spoel. - Gromacs 3.0: A package for molecular simulation and trajectory analysis. *J. Mol. Mod.* 7, 306-317 2001.
5. B.R. Brooks, R.E. Bruccoleri, B.D. Olafson, D.J. States, S. Swaminathan and M. Karplus, CHARMM: A Program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J. Comput. Chem.*, 4, 187-217, 1983.
6. A.H.Pogosyan, G.A.Yegiazaryan, H.H.Gharabekyan, A.A.Shahinyan The GROMACS and NAMD software packages comparison. *Commun. Comput. Phys.*, 1, 4, 736-743, 2006.
7. A.A.Shahinyan, A.H.Pogosyan, G.A.Yegiazaryan, H.H.Gharabekyan A Software tool for construction of biomembranes. *Electronic J. of Natural Sci.*, 1, 2, 2004.
8. Op den Kamp JAF, Roelofsen B & van Deenen LLM Structural and dynamic aspects of phosphatidylcholine in the human erythrocyte membrane. *Trends Biochem Sci* 8, 320-323, 1985.
9. Blume, A. Dynamic properties. *Phospholipid Handbook*. Gregor Cevc (editor), Marcel Dekker, New York, 455-552, 1993.
10. T J O'Leary. - Lateral diffusion of lipids in complex biological membranes. *Proc. Natl Acad Sci USA.*, 84, 2, 429–433, January 1987.
11. Tanford, C. *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*, 1st Ed. 1-200, John Wiley & Sons, New York 1973 New York, 1973.
12. Kevin R. MacKenzie, James H. Prestegard, Donald M. Engelman., A transmembrane helix dimmer: Structure and Implications. *Science*, 276, 4 131-133, april 1997.
13. Horia I. Petrache, Alan Grossfield, Kevin R. MacKenzie, Donald M. Engelman and Thomas B. Woolf, Modulation of Glycophorin A Transmembrane Helix Interactions by Lipid Bilayers: Molecular Dynamics Calculations., *J. Molec. Biol.*, 302, 727-746. 2000.

Поступила 27.11.2009.



Biol. Journal of Armenia, 1 (62), 2010

## BINDING OF SOME CATIONIC PORPHYRINS WITH SERUM ALBUMIN

G.V. GYULKHANDANYAN<sup>1</sup>, A.G. GYULKHANDANYAN<sup>2</sup>,  
L.Zh. GYULKHANDANYAN<sup>3</sup>, R.K. GHAZARYAN<sup>4</sup>, G.V. AMELYAN<sup>1</sup>,  
E.S. GEVORGYAN<sup>2</sup>, G.A. KEVORKIAN<sup>3</sup>, V.A. SAKANYAN<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biotechnology, Yerevan, Armenia;

<sup>2</sup>Faculty of Biology, Yerevan State University, Armenia;

<sup>3</sup>Institute of Biochemistry NAS RA, Yerevan, Armenia;

<sup>4</sup>Department of Organic Chemistry, Yerevan State Medical University, Armenia;

<sup>5</sup>ProtNeteomix Co. Ltd., Nantes, France

It is shown, that the methods of absorption and fluorescence spectroscopy allow determining the binding constants of porphyrins with various types of serum albumin (SA) and their localization on the protein globule correctly enough. Researches testify about good binding of porphyrins with protein at low ionic strength of solution whereas at 0,1 M buffer solution the interaction of bovine serum albumin with porphyrins is considerably weak. Values of binding constants of cationic porphyrins prove their sorption not only on the surface of proteins but also in the globule of SA, which is confirmed also by computer simulation of SA-porphyrin interaction.

### *Bovine serum albumin – cationic porphyrins – binding constants*

Ցույց է տրված, որ կլանման և ֆլուորեսցենտային սպեկտրասկոպիայի մեթոդները թույլ են տալիս բավականին ճշգրիտ որոշել պորֆիրինների կապման հաստատունները շիճուկային ալբումինի (ՇԱ) տարբեր տեսակների հետ և նրանց տեղայնացումը սպիտակուցի վրա: Հետազոտությունները վկայում են որ ցածր իոնային ուժի դեպքում պորֆիրինները լավ են կապվում սպիտակուցի հետ, մինչդեռ 0,1 M բուֆերի լուծույթում ցույց չիճուկային ալբումինի համագործակցությունը պորֆիրինների հետ զգալիորեն թույլ է: Կատիոնային պորֆիրինների կապման հաստատունների մեծությունները վկայում են նրանց տրոֆիայի մասին սպիտակուցի ինչպես մակերևույթի վրա, այնպես էլ գլոբուլի մեջ, ինչը նույնպես հաստատվում է համակարգչային մոդելավորումով ՇԱ-պորֆիրին փոխազդեցության ուսումնասիրությամբ:

### *Ցույցի շիճուկային ալբումին - կատիոնային պորֆիրիններ - կապման հաստատուններ*

Показано, что методы абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии позволяют достаточно корректно определять константы связывания порфиринов с различными типами сывороточного альбумина (СА) и их локализацию на белковой глобуле. Исследования свидетельствуют о хорошем связывании порфиринов с белком при низкой ионной силе, тогда как в 0,1 М растворе буфера взаимодействие бычьего сывороточного альбумина с порфиринами значительно слабее. Константы связывания катионных порфиринов свидетельствуют об их сорбции как на поверхности белка, так и внутри глобулы СА, что подтверждается также компьютерным моделированием взаимодействия СА □ порфирин.

### *Бычий сывороточный альбумин – катионные порфирины – константы связывания*

The cationic photosensitizers (porphyrins) are the main form of compounds, which are widely used in photodynamic therapy of tumors (PDT) and photodynamic inactivation (PDI) of microorganisms. Photosensitizers (PS) are selectively accumulated by malignant cells and via photoirradiation provide a means of highly specific cell killing [19]. The high selectivity of cationic porphyrins has been used for tumor destruction in vivo [24]. Due to their positive charge and lipophilicity, these compounds are localized in mitochondria in response to a negative-inside membrane potential [6], and there is evidence to suggest that the mitochondrion may be a primary subcellular site of damage. Cationic photosensitizers also show high activity in photodynamic inactivation of microorganisms, where they are successfully used for both Gram (+) and Gram (-) microorganisms [21] and fungi [3].

The study of cationic photosensitizers binding and carrier is very important for PDT. On the organism level the PS transport to tumors is done by blood carrier proteins such as serum albumin (SA) [5, 22], low and high density lipoproteins [14], and hemoglobin [23]. The study of porphyrins binding to proteins on molecular level will clarify binding mechanisms and determine medium impact. In the blood plasma protein system the serum albumin takes leading place, considering its large amount (about 60% of plasma proteins) and its functions [20]. It possesses a wide range of physiological functions involving the binding, transport, and delivery of fatty acids, porphyrins, bilirubin, tryptophan, thyroxine, and steroids [2, 8]. In the present work, bovine serum albumin (BSA) is selected as protein model, because it has wider application than human serum albumin (HSA) and is suitable not only for humans, but also for other animals, and there is lack of information on the porphyrin-BSA binding mode [13, 15, 18]. At the same time there are not enough studies on pH and solution ionic strength, as well as cationic porphyrins lateral radicals' impact on their binding to BSA. The main purpose of present study is investigation of above mentioned factors on cationic porphyrins-BSA binding via spectral methods.

**Material and Methods.** BSA (Product Number A2153), BSA Fatty Acid Free (Product Number A6003), HSA Fatty Acid Free (Product Number A1887) were obtained from Sigma-Aldrich Chemical Co. (USA) and used without further purification. The new water-soluble symmetrically and asymmetrically meso-substituted cationic N-quaternized 3- and 4-pyridylporphyrins and metalloporphyrins (Zn, Ag, Co, Fe, Mn, Cu, et al.) with different lateral functional groups (oxyethyl, butyl, allyl, and methallyl) were synthesized according to our previously reported methods [9]. The structure of the synthesized compounds was confirmed by nuclear magnetic resonance (NMR), infrared and absorption spectroscopy methods. The following porphyrins used in this work:

- meso-tetra-[4-N-(2'-oxyethyl)pyridyl]porphyrin (TOE4PyP), Zn-TOE4PyP;
- meso-tetra-[4-N-(2'-butyl)pyridyl]porphyrin (TBut4PyP), Zn-TBut4PyP;
- meso-tetra-[4-N-(2'-allyl)pyridyl]porphyrin (TAlI4PyP), Zn-TAlI4PyP;
- meso-tetra-[4-N-(2'-methallyl)pyridyl]porphyrin (TMetAlI4PyP), Zn-TMetAlI4PyP.

The binding ability of these preparations was compared with the well-known photosensitizer chlorophyll *a* [16] (Chl *a*, "The enterprise on manufacture of diagnostic and medicinal preparations", Minsk, Belorussia). All other materials were of analytical grade.

**Measurements and methods.** Fluorescence emission spectra were measured with ETC-273 FP-6500 spectrofluorometer (JASCO). Fluorescence spectra of BSA and porphyrins-BSA complex were recorded from 300 to 450 nm (excitation at 295 nm). In fluorescence investigations binding of the porphyrins to BSA were studied by titration of the protein with increasing concentrations of the porphyrins and monitoring the changes in the fluorescence spectra of protein-bound versus free porphyrin. For the quantitative analysis of the interaction between porphyrins with BSA, the Stern-Volmer equation was used. For static quenching, fluorescence quenching can be analyzed using modified Stern-Volmer relation [17]:

$$I_0 / I_0 - I = 1 / fK[C_p] + 1 / f \quad (1)$$

where  $I$  and  $I_0$  are the fluorescence intensities of BSA in the presence and absence of quencher (porphyrin), respectively;  $K$  is the Stern–Volmer quenching constant and  $[Cp]$  is quencher concentration;  $f$  is the fraction of the initial fluorescence accessible to quencher. In the linear plots  $I_0 / I_0 - I$  versus  $1 / [Cp]$  yields  $1 / f$  as the intercept, and  $1 / fK$  as the slope. The static quenching interaction between cinnamic acid and BSA indicates [2], that the quenching constant ( $K$ ) decreased with the temperatures increasing. It was found that the quenching constant ( $K$ ) decreased with the temperatures increasing, which indicates the static quenching interaction between cinnamic acid and BSA. The results interpreted as the binding constant of the complexation reaction because static quenching arises from the formation of a dark complex between fluorophore and quencher [2, 7]. Experiment results on BSA-chlorine e6 binding show that Stern–Volmer static quenching constants  $K$  determined from data on protein fluorescence quenching closely match to binding constants determined from polarizing measures of chlorine e6 luminescence [15]. According to these results we will consider that determining Stern–Volmer constant  $K$  we define protein-porphyrin binding constants.

UV–Vis absorbance spectra were measured with a Shimadzu UV–VISIBLE Recording Spectrophotometer UV-2100 (Japan). In absorption spectroscopy investigations binding of the porphyrins to BSA were studied by titration of the porphyrins with increasing concentrations of the BSA and monitoring the changes in the absorption spectra of porphyrins-bound versus free BSA. The binding constant  $K$ , for the interactions porphyrins-BSA was determined by analyzing the reduced absorbances at Soret band (for example 440 nm for Zn-TOE4PyP) due to addition of BSA to the porphyrin solution following the modified relation of Kapp et al. [12]:

$$A_0 / A_0 - A = 1 / fK[C_{prot}] + 1 / f \quad (2)$$

where  $A_0$  and  $A$  are the porphyrin absorbances in the absence and presence of the protein (BSA), respectively. In the linear plots  $A_0 / A_0 - A$  vs.  $1 / [C_{prot}]$ ,  $1 / f$  is obtained from the intercept on the  $A_0 / A_0 - A$  axis, corresponding to  $1 / [C_{prot}] = 0$ .

By defining values of intensity  $I_0$  ( $A_0$ ) and  $I$  ( $A$ ) we used “Spectra Manager for Spectra Analysis, Version 1.53.00 JASCO Corporation, 2000” software. This software corrects fluorescence intensity  $I$  or absorbance  $A$  value considering asymmetric spectra and shift from baseline (zero line). The value of  $K$  defined according to relations of Stern–Volmer (1) or Kapp (2).

The results of experiments have been processed statistically using the criterion of Student.

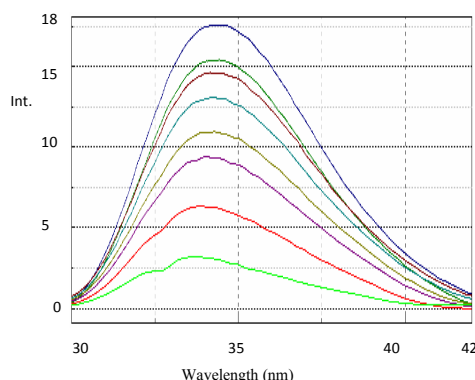
**Results and discussion.** Numerous studies on fatty acids, porphyrins and other ligands binding done with methods of equal dialysis, fluorescent and absorption spectroscopy as well as electron spine resonance (ESR) and X-ray analysis show that serum albumin molecule has several types of ligands binding sites [8, 15]. From the analysis of its primary structure, HSA appears to be formed by three homologous domains (named I, II, and III) with two separate helical sub domains (named A and B) for each domains [8]. According to the data obtained by X-ray analysis, nuclear magnetic resonance, ESR, spectral and other methods, number of fatty acid binding sites on SA molecule varies between 2 to 8 with binding constants from  $10^4$  to  $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ . HSA is able to bind seven equivalents of long-chain fatty acids (FAs) at multiple binding sites with different affinities. In sites FA1-FA5 carboxylate moiety of fatty acids is anchored by electrostatic/polar interactions. On the contrary, sites FA6 and FA7 do not display a clear evidence of polar interactions that keep in place the carboxylate head of the fatty acid, thus suggesting that sites FA6 and FA7 are low-affinity FA binding sites [8, 10]. These studies show that five sub domains of SA apparently, except the sub domain IA, bind fatty acids. Naturally, here emerges the question: where and how bind multiple other ligands, particularly porphyrins? Studies of heme-SA binding show the allosteric type of heme binding regulation with medicine (warfarin). In fact, the affinity of HSA for heme decreases by about one order of magnitude upon warfarin (anticoagulant) binding; likewise, heme binding to HSA decreases the warfarin affinity by the same extent [1]. Studies on ligand binding constants definition explain this kind of SA behavior. Spectral studies are able to show rather exact quantitative characteristics,

comparison of which can explain mechanisms of SA interaction with such important molecules as fatty acids, porphyrins, medicines and etc. Herein the studies with two independent spectral methods such as fluorescence and absorption spectroscopy will complete each other.

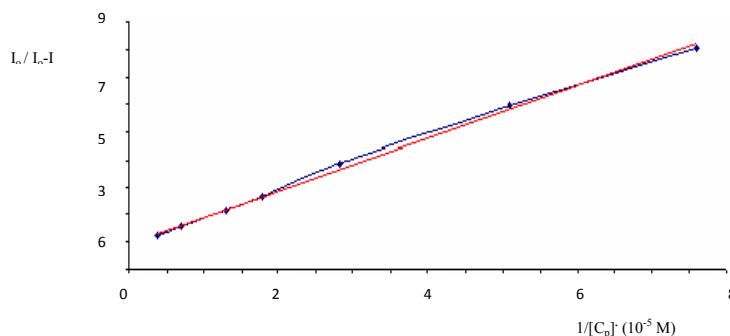
The interaction of water-soluble cationic porphyrins with bovine serum albumin was studied at variable ionic strength and pH of phosphate buffer solution (PBS).

**Fluorescence study on interaction of porphyrins with BSA.** The interaction of porphyrins with bovine serum albumin was examined by fluorescence emission spectra of BSA at the excitation wavelength 295 nm. We have studied BSA molecule binding with 8 cationic porphyrins and well known photosensitizer chlorine  $e_6$  used in clinics. In a typical experiment BSA  $1,5 \times 10^{-6}$  M solution (0.01 M PBS, pH 7,2) titrated with increasing concentrations of porphyrin ( $1,3 \times 10^{-6}$  M –  $2,7 \times 10^{-5}$  M). As an example, in Fig. 1 shows the fluorescence emission spectra of BSA with the addition of different concentrations of porphyrin TAl4PyP (ratio  $C_{\text{porph}}/C_{\text{protein}} = 0,88; 1,31; 2,36; 3,77; 5,17; 9,61; 17,93$ ).

In all experiments it can be found, that the fluorescence intensity of BSA decreased and the maximum of fluorescence emission wavelength had a slight blue shift (so, for porphyrin TAl4PyP from 343,5 nm to 338 nm, Fig. 1) with the increasing in porphyrin concentration. The results showed that the binding of porphyrins to BSA, as well as cinnamic acid [2], is associated with conformation changes in BSA, suggesting, that after adding the solution of porphyrins the chromophore of BSA was placed in more hydrophobic environment [25].



**Fig. 1.** Typical emission spectra of the titration of BSA by different concentrations of porphyrin ( $\lambda_{\text{ex}}=295$  nm,  $\lambda_{\text{em}}=343.5$  nm).



**Fig. 2.** Stern-Volmer curve for quenching of BSA with porphyrin TAl4PyP. The points are experimental data and a straight line is the theoretical curve according to equation (1).

The typical Stern–Volmer graph in Fig. 2 is shown (the titration of BSA by porphyrin TAlI4PyP). Here  $I$  and  $I_0$  are the fluorescence intensities of BSA in the presence and absence of porphyrin, respectively;  $K$  is the Stern–Volmer binding constant (quenching constant) and  $[C_p]$  is porphyrin concentration. It can be found that plot is linear. According to formula (1) and “Spectra Manager for Spectra Analysis” we have estimated binding constants  $K$  for all 9 studied porphyrins for 3 different types of serum albumin: BSA, BSA Fatty Acids Free and Human SA Fatty Acids Free (Table 1). For BSA binding constant  $K$  values obtained for cationic porphyrins were approximately from 2 to 7 times less than for chlorine  $e_6$  (Table 1, column 1). It was determined before [15], that chlorine  $e_6$  resides in inner, hydrophobic parts of BSA molecule, and has high binding constant, more than  $10^6 \text{ M}^{-1}$ . The results determined by us can be interpreted as cationic porphyrins binding on the surface of BSA molecule. BSA which has negative charged amino acid residues on the surface and negative charge in general (neutral pH) [4], binds positive charged porphyrins on the surface of globule, preventing them from entering hydrophobic (inner) parts of molecule. As the result binding constants generally are compatibly smaller. However the value of a binding constant some of porphyrins (TOE4PyP, Zn-TOE4PyP, TBut4PyP, Zn-TBut4PyP) not much more differs from a binding constant for chlorine  $e_6$ , that specifies their possible binding inside of serum albumin globule.

Table 1. Estimated values of porphyrin – SA binding constants ( $K$ ) (in 0,01 M PBS, pH 7,2)

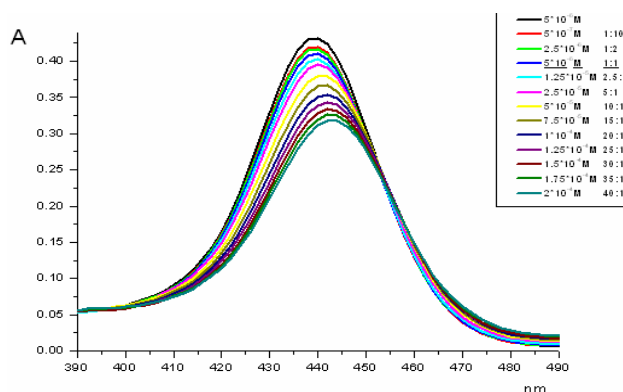
**Spectrophotometric study on interaction of porphyrins with BSA.** In literature there are a lot of data on binding constants values of different porphyrins with serum albumin (human and bovine), obtained by UV-VIS spectroscopy and fluorescence methods. These values were obtained in different mediums and experiment conditions, and as a matter of fact the values differ a lot [5, 13, 15, 18]. We have made an attempt to

| NN | Porphyrins     | BSA,<br>$K (10^5 \text{ M}^{-1})$ | BSA Fatty Acids<br>Free,<br>$K (10^5 \text{ M}^{-1})$ | HSA Fatty Acids<br>Free,<br>$K (10^5 \text{ M}^{-1})$ |
|----|----------------|-----------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|    |                | 1                                 | 2                                                     | 3                                                     |
| 1  | TOE4PyP        | 3,48                              | 2,83                                                  | 1,94                                                  |
| 2  | Zn-TOE4PyP     | 2,01                              | 1,23                                                  | 3,13                                                  |
| 3  | TBut4PyP       | 2,35                              | 2,16                                                  | 1,51                                                  |
| 4  | Zn-TBut4PyP    | 2,29                              | 2,51                                                  | 2,79                                                  |
| 5  | TAlI4PyP       | 1,01                              | 1,84                                                  | 1,42                                                  |
| 6  | Zn-TAlI4PyP    | 1,02                              | 0,69                                                  | 1,47                                                  |
| 7  | TMetAlI4PyP    | 1,89                              | 1,83                                                  | 1,16                                                  |
| 8  | Zn-TMetAlI4PyP | 1,77                              | 1,92                                                  | 1,45                                                  |
| 9  | Chlorine $e_6$ | 6,44                              | -                                                     | -                                                     |

study *in vitro* medium factor (pH and ionic strength of solution) impact on porphyrin Zn-TOE4PyP binding to bovine serum albumin.

In the first group of experiments we have studied the influence of pH (from 4,0 to 9,5) on porphyrin Zn-TOE4PyP binding with bovine serum albumin. In all experiments the ionic strength of solution was constant and quite low (measurements were taken in 0,01 M PBS, ionic strength 0,04). Proportion of protein – porphyrin was changed from 0,1 to 40. The study was taken under 20°. A typical example of the absorption spectra obtained by titration of Zn-TOE4PyP with increasing concentration of BSA is shown in Fig. 3 (pH = 6,15). Fig. 3 shows the shift of Soret band into the area of more long waves (bathochromic effect) and also a decrease of absorption intensity (hypochromic effect). Observed hypochromic change can be explained with appearance of complexes BSA–porphyrin in solution where chromophore exists in more ordered form compared

to its free state. Intensifying titration led to the increase of the portion of bound porphyrin in the solution. Therefore, the hypochromic change increases until further increase of BSA concentration does not influence on spectra. Existence of isosbestic point (point of intersection of curves) on absorption spectra indicates that porphyrin in solution can be only in two states - free and bound with BSA. pH changes towards alkaline values bring to more crucial shifts of hypochromic and bathochromic effects.



**Fig. 3.** Typical absorption spectra of Zn-TOE4PyP ( $5 \times 10^{-6}$  M, top curve) titration with increasing concentration of BSA (ratio protein/porphyrin presented at right).

Similarly to fluorescent studies, graphics according to modified relation of Kapp (2) were built. Similar graphic dependencies were obtained like in Fig. 2, however on the axis y instead of  $I_0 / I_0 - I$  was entered  $A_0 / A_0 - A$ , and on the axis x a values  $1 / [C_{\text{prot}}]$ . Here  $A$  and  $A_0$  are the absorbance intensities of porphyrin Zn-TOE4PyP in the presence and absence of BSA, respectively;  $K$  is the binding constant and  $[C_{\text{prot}}]$  is the BSA concentration. It can be found that plot also is linear. According to relation (2) and by running "Spectra Manager for Spectra Analysis" software we have determined binding constants  $K$  for porphyrin Zn-TOE4PyP under various pH (Table 2) and ionic strength of solution (Table 3). Study results of porphyrin Zn-TOE4PyP binding with bovine serum albumin under various values pH of solution are presented in Table 2.

Table 2. Studies of porphyrin Zn-TOE4PyP binding with bovine serum albumin under various pH of solution

| NN | Molarity of buffer, M | pH   | Binding constant, $M^{-1}$ |
|----|-----------------------|------|----------------------------|
| 1. | 0,01                  | 4,0  | $5,95 \times 10^4$         |
| 2. | 0,01                  | 6,15 | $1,38 \times 10^5$         |
| 3. | 0,01                  | 7,2  | $1,78 \times 10^5$         |
| 4. | 0,01                  | 8,25 | $2,59 \times 10^5$         |
| 5. | 0,01                  | 9,0  | $3,42 \times 10^5$         |
| 6. | 0,01                  | 9,5  | $1,98 \times 10^6$         |

As we can see from Table 2, the binding constant increases by 33 times along with increase of pH from acid (4.0) to alkaline (9.5) medium. Under medium pH changes at pH 7,2 compared to pH 4,0 takes place rapid decrease of binding constant 3 times, which shows BSA conformation changes from globular to extended ellipsoid [11] and porphyrin outgo from SA molecule in the medium. Under pH 9,5 takes place rapid increase of binding constant, more than 11 times compared to pH 7,2. This reflects in grows of bathochromic effect: big shift of absorption peak for 10 nm (from 440 to 450 nm).

In the second part of study we have investigated the influence of ionic strength on porphyrin Zn-TOE4PyP binding to bovine serum albumin. During the experiments pH

of solution was kept constant 7,2. Experiment results of porphyrin Zn-TOE4PyP binding to bovine serum albumin under constant pH (7,2) and different ionic strength of solutions are presented in Table 3. As we can see from Table 3, with increase of molarity (ionic strength) a decrease of binding constant takes place, which shows probable conformation changes of molecule BSA under medium changes [11]. This can be also explained by partial neutralization of albumin molecule charge (under pH 7.4 negative charge of albumin is 18 [4]) under increase of phosphate buffer positive ions in the medium (increase of solution molarity from 0,01 to 0,1 M), and negative ions of buffer probably partially deprotonize of porphyrin molecules. Under this conditions electrostatic interaction of cationic porphyrins with negative groups of amino acid residues weakens, which reflects in decrease of binding constant. Optimum conditions *in vitro* experiments is a molarity corresponding 0,01 M phosphate buffer.

Table 3. Porphyrin Zn-TOE4PyP – bovine serum albumin binding studies under solution different molarities

| NN | Molarity of buffer, M | pH  | Binding constant, $M^{-1}$ |
|----|-----------------------|-----|----------------------------|
| 1  | 0,01                  | 7,2 | $1,78 \times 10^5$         |
| 2  | 0,03                  | 7,2 | $1,39 \times 10^5$         |
| 3  | 0,05                  | 7,2 | $1,05 \times 10^5$         |
| 4  | 0,1                   | 7,2 | $1,06 \times 10^5$         |

Thus, studies of Zn-TOE4PyP and serum albumin interaction showed not specific and reversible nature of this interaction. This kind of interaction mechanism makes possible the equality between porphyrin bound with albumin and porphyrin bound with tissue elements. As a result, the porphyrin has an ability to accumulate in tissues with high affinity to it, have a therapeutic action, and then wash away from the tissue. At the same time electrostatic type of binding lets porphyrin to compete with other substances, which can be transported by albumin, and particularly with fatty acids. The data obtained can be used for further study of competitive binding of fatty acids and porphyrins with binding sites of serum albumin macromolecule. The importance of the studies on porphyrin binding with biological structures in the aspect of synthesis porphyrin based of medicines for PDT should be noted.

**Computer simulation of SA-porphyrin interaction.** Above-mentioned results were used for construction of computer models of SA-porphyrins (TOE4PyP, TBut4PyP and TAlI4PyP) interaction. Probable conformations of their binding have been done via 50-step-by-step docking by means of the program AutoGrid 4, AutoDock 4 software. It is shown, that these porphyrins are located in a "pocket" of subdomain I B of SA globule.

**Acknowledgements.** Our thanks due to Dr. F. Fleury (University of Nantes, France) for useful discussions. The work was financially supported by the ProtNeteomix Co. (Nantes, France) and by the grant of Federation of European Biochemical Societies /FEBS/ (2008).

## REFERENCES

1. Baroni S., Mattu M., Vannini A., Cipollone R., Aime S., Ascenzi P., and Fasano M. "Effect of ibuprofen and warfarin on the allosteric properties of haem-human serum albumin. A spectroscopic study". *Eur. J. Biochem.*, 268, 6214-6220, 2001.
2. Bian H., Zhang H., Yu Q., Chen Z., Liang H. "Studies on the interaction of cinnamic acid with bovine serum albumin". *Chem. Pharm. Bull.*, 55, 6, 871-875, 2007.
3. Carre V., Gaud O., Sylvian I., Bourdon O., Spiro M., Blais J. Granet R., Krausz P., Guilloton M.J. "Fungicidal properties of meso-aryl glycosylporphyrins: influence of sugar substituents on photoinduced damage in the yeast *Sacharomyces cerevisiae*". *Photochem. Photobiol.*, 48, 57-62, 1999.

4. *Cheger S.I.* Carrier functions of serum albumin, Academy of Soc. Rep. of Romania Press, Bucharest, 19-80, 1975.
5. *Cohen S., Margalit R.* "Binding of porphyrin to human serum albumin". *Biochem. J.*, 270, 325-330, 1990.
6. *Davis S., Weiss M. J., Wong J. R., Lampidis T. J., and Chen L. B.* "Mitochondrial and plasma membrane potentials cause unusual accumulation and retention of rhodamine 123 by breast adenocarcinoma-derived MCF-7 cells". *J. Biol. Chem.*, 260, 13844-13850, 1985.
7. *Eftink M.R., Ghiron C.A.* "Dynamics of a protein matrix revealed by fluorescence quenching". *J. Phys. Chem.*, 80, 486-493, 1976.
8. *Fasano F., Curry S., Terreno E., Galliano M., Fanali G., Narciso P., Notari S., and Ascenzi P.* "The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin". *IUBMB Life*, 57, 12, 787-796, 2005.
9. *Ghazaryan R.K., Sahakyan L.A., Tovmasyan A.G., Vardanyan S.G., Gazaryan A., Aloyan L., Gyulkhandanyan G.V., Hovhannesian V.E.* "Synthesis of new water-soluble cationic porphyrins and their catalytic and biological activity". *ISTC 7th International Seminar, Scientific Advances in Chemistry: Heterocycles, Catalysis and Polymers as Driving Forces*, November, 2004, Abstracts, p.40, Yekaterinburg, Russia, 2004.
10. *Hamilton J.A.* "Fatty acids interactions with proteins: what X-ray crystal and NMR solution structures tell us". *Prog. Lipid. Res.*, 43, 177-199, 2004.
11. *Joli M.* Physical chemistry of proteins denaturation. "Mir" Press, Moscow, 1968.
12. *Kapp E.A., Daya S. and Whitley C.G.* "Protein-ligand interactions: Interaction of nitrosamines with nicotinic acetylcholine receptor". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 167, 1383-1392, 1990.
13. *Karapetyan N.H., Madakyan V.N.* "Investigation of the interaction of new porphyrins with bovine serum albumin". *Bioorganicheskaya Khimiya*, 30, 2, 172-177, 2004.
14. *Kessel D.* "Porphyrin-lipoprotein association as a factor in porphyrin localization". *Cancer Lett.*, 33, 183-188, 1986.
15. *Kochubeev G.A., Frolov A.A., Zenkevich E.I., Gurinovich G.P.* "Behaviors of complexation of chlorin e6 with serum albumin of human and bovine". *Moleculyarnaya Biologiya*, 22, 4, 968-975, 1988.
16. *Kostenich G.A., Zhuravkin I.N., Furmanchuk A.V., Zhavrid E.A.* "Photodynamic therapy with chlorin e6 : a morphologic study of tumor damage efficiency in experiment". *J. Photochem. Photobiol.*, 11, 3-4, 307-318, 1991.
17. *Lakowitz J.R.* Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2nd ed., Kluwer Academic Publishers/Plenum Press, New York, 1999.
18. *Ma H.M., Chen X., Zhang N., Han Y.Y., Wu D., Du B., Wei Q.* "Spectroscopic studies on the interaction of a water-soluble cationic porphyrin with proteins". *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.*, 72, 3, 465-469, 2009.
19. *Oseroff A. R., Ara G., Ohuoha D., Aprille J. R., Bommer J. C., Yarmush M. L., Foley J., and Cincotta L.* "Strategies for selective cancer photochemistry: antibody-targeted and selective carcinoma cell photolysis". *Photochem. Photobiol.*, 46, 83-96, 1987.
20. *Peters T.* All about albumin. Biochemistry, genetics and medical applications, Academic Press, San Diego, CA, 1996.
21. *Reddi E., Ceccon M., Valduga G., Jori G., Bommer J.C., Elisei F., Latterini L., and Mazzucato U.* "Photophysical properties and antibacterial activity of meso-substituted cationic porphyrins". *Photochem. Photobiol.*, 75, 5, 462-470, 2002.
22. *Reddi E., Ricchelli F and Jori G.* "Interaction of human serum albumin with hematoporphyrin and its Zn(2)+-and Fe(3)+-derivatives". *Int. J. Pept. Protein Res.*, 18, 402-408, 1981.
23. *Sil S., Bose T., Roy D., and Chakraborti A.S.* "Protoporphyrin IX-induced structural and functional changes in human red blood cells, haemoglobin and myoglobin". *J. Biosci.*, 29, 3, 101-111, 2004.
24. *Villaneuva A., Caggiari L., Jori G. and Milanese C.* "Morphological aspects of an experimental tumour photosensitized with a meso-substituted cationic porphyrin". *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 23, 49-56, 1994.
25. *Yuan T., Weljie A.M., Vogel H.J.* "Tryptophane fluorescence quenching by methionine and selenomethionine residues of calmodulin: orientation of peptide and protein binding". *Biochemistry*, 37, 9, 3187-3195, 1998.

Received 25.12.2009



Биолог. журн. Армении, 1 (62), 2010

## ИНДИВИДУАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПОВЕДЕНИЯ МЫШЕЙ В ТЕСТЕ «ЧЕРНО-БЕЛАЯ КАМЕРА»

Г.Т.САРКИСОВ<sup>1</sup>, Р.Ш.САРКИСЯН<sup>2</sup>, Л.М.КАРАПЕТЯН<sup>1</sup>,  
Н.Э.АКОПЯН<sup>1</sup>, Ж.С.САРКИСЯН<sup>1</sup>, И.Р.МАДАТОВА<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научный Центр Зоологии и Гидроэкологии НАН РА

E-mail: sarkgagik@graffiti.net

<sup>2</sup>Институт физиологии имени академика Л.А. Орбели НАН РА

Изучались индивидуальные различия в поведении беспородных мышей-самцов. Типизация животных проводилась по параметрам поведения в «черно-белой» камере. Животные были дифференцированы на две группы особей с высоким и низким уровнем базовой тревожности. Установлено, что различия в поведении не проявляются при тестировании в «открытом поле», но при этом отражаются в сигналах физиологического состояния животных, регистрируемых «Биоскопом».

*«Черно-белая» камера – типизация мышей - тревожность*

Ուսումնասիրվել են ոչ գծային արու մկների վարքագծի անհատական առանձնահատկությունները: Կենդանիների տեսակավորումը կատարվել է ըստ վարքագծային չափանիշների, սև ու սպիտակե խցիկում: Փորձնական կենդանիները բաժանվել են երկու խմբի ըստ հիմնային տազնապի զգացողության բարձր և ցածր մակարդակի: Պարզվել է, որ վարքագծային տարբերությունները չեն դիտարկվում, բաց դաշտում թեստավորման դեպքում, սակայն այդ տարբերություններն արտահայտվում են կենդանիների ֆիզիոլոգիական վիճակի ազդանշանների, Բիոսկոպով գրանցման ժամանակ:

*Սև-սպիտակե խցիկ □ մկների տեսակավորում □ տազնապ*

The individual differences in the behaviour of male mice were studied. The typification of animals was out within the methods of “light-dark” box. The animals were differentiated into two groups according to the low or high level of basic anxiety. It was concluded that the difference in the behaviour is not demonstrated in «open field», but is reflected in the signals of physiological state of animals registered by a Bioscope.

*“Light-dark” box - tipification of mice - anxiety*

Разработка эффективных способов оценки индивидуально-типологических особенностей животных с помощью поведенческих моделей представляет один из актуальных разделов нейробиологии поведения, имеющих как фундаментальный, так и прикладной аспект. В частности, в качестве перспективного направления исследований, включающего указанные аспекты, обсуждается проблема связи между индивидуальными особенностями поведения животных и устойчивостью к патогенным воздействиям [6, 11].

В настоящее время преобладает подход к исследованию индивидуальной реактивности животных, основанный на оценке определенных эмоциональных состояний (склонность к тревоге, страху, ярости, депрессии).

Можно выделить по меньшей мере четыре типа поведенческих моделей, которые могут использоваться в подобных исследованиях.

1. Модели, основанные на зоосоциальных, обычно внутривидовых, отношениях между животными, например, в условиях спровоцированной агрессии [4], или «эмоционального резонанса» [13].
2. Модели, демонстрирующие склонность животных к развитию депрессивно-подобного состояния в условиях неизбежных авersiveных раздражителей. К наиболее часто используемой модели данного типа относится тест Порсолта (поведенческий тест «отчаяния» или вынужденного плавания) [21].
3. Модели, основанные на провоцировании конфликтной ситуации обычно посредством поощрения и наказания одного и того же условнорефлекторного ответа животного [20]. Возможна типизация животных по степени ингибирования их поведенческой активности.
4. Модели, ориентированные на анализ спонтанного поведения при помещении животных в незнакомую для них среду. К основным поведенческим моделям данного типа относятся: «открытое поле», «норковая камера», «крестообразный приподнятый лабиринт», «Суок-тест», «черно-белая камера» [3,5,9,10,16,19,22]. Они обычно рассматриваются в качестве экспериментальных моделей тревожности и широко используются в современной психофармакологии при решении задач скрининга лекарственных препаратов.

В настоящем сообщении представлены результаты исследований индивидуальных особенностей поведения мышей в тесте «черно-белая камера» (ЧБК).

**Материал и методика:** ЧБК представляет собой закрытый ящик, состоящий из двух отсеков, разделенных перегородкой: большого светлого (30х26х20см), пол которого разделен на 25 квадратов, и малого темного (10х10х20см). Отсеки сообщаются между собой через отверстие в перегородке (3х3см), которое имеет выдвижную вертикальную дверцу.

Сверху темный отсек снабжен плотно подогнанной открывающейся наверх крышкой. Над светлым отсеком располагается электрическая лампа мощностью 40 Вт.

Эксперименты проводили на 10 беспородных белых мышах-самцах (возраст 3-4 месяца).

Тестирование проводили в дневное время, в промежутке между 11 и 13 часами.

При эксперименте мышь опускалась в темный отсек камеры, после чего камера закрывалась сверху крышкой. Дверца в перегородке также была плотно закрыта. В полной темноте мышь адаптировалась к темному отсеку. Привыкание длилось 300 сек., после чего над светлым отсеком зажигалась электрическая лампочка и открывали дверцу в перегородке. Собственно тестирование длилось 300 сек., в ходе которых визуальное и видеокamerой регистрировали поведение животных.

В ходе эксперимента регистрировали следующие поведенческие показатели: число и латентность (сек) выглядываний из темного отсека в светлый через отверстие в перегородке, число выходов в светлый отсек. Выглядыванием считалось частичное или полное пересечение животным условного порога в отверстии центральной перегородки между отсеками.

Под выходом понималось любое продвижение в сторону освещенного отсека, которое сопровождалось двигательной-исследовательской активностью в этом отсеке. При этом регистрировали число пересеченных квадратов (локомоции) и вертикальные стойки. Регистрировалась также суммарная длительность (в с) выглядываний и выходов в освещенную часть камеры.

Через 7 дней после экспериментов в ЧБК всех животных тестировали в режиме «открытого поля» (ОП). Процедура тестирования состояла в следующем: животное помещали в угол светлого отсека при закрытом отверстии в темный отсек. В течение 300 с. регистрировали число пересеченных квадратов и вертикальные стойки.

Показатели локомоций и стоек представляли отношением абсолютного числа пересеченных квадратов или стоек ко времени (в с) нахождения животного в светлом отсеке (ОП).

Еще одну серию экспериментов проводили с использованием прибора «Биоскоп», позволяющего бесконтактно оценивать физиологическое состояние животного [12,17]. Эксперименты проводили на бодрствующих животных через сутки после опытов в ОП.

Результаты исследований обрабатывались с использованием пакета программ «Origin Pro 75».

**Результаты и обсуждение.** Используемая процедура тестирования поведения в ЧБК предоставляет животному возможность выбора: или активно исследовать новую ситуацию (светлый отсек), или оставаться в пределах темного ограниченного пространства (экологически характерная для грызунов форма защитного поведения).

Исследовательская активность инициируется потребностью в новой информации как таковой, которая как и другие потребности организма (например, потребности в пище, воде, особи противоположного пола и др.) у многих видов животных, в том числе грызунов, имеет самостоятельное значение и чрезвычайно сильна [10,14]. В то же время потребность самосохранения в условиях определенной аверсивности открытого и освещенного пространства (светлый отсек) побуждает животное к ожиданию от новизны потенциальной угрозы, вызывая реакцию тревоги [18].

Таким образом, сдвиг баланса конкурирующих потребностей в ту или иную сторону определяет результирующий тип поведения подопытного животного в ЧБК.

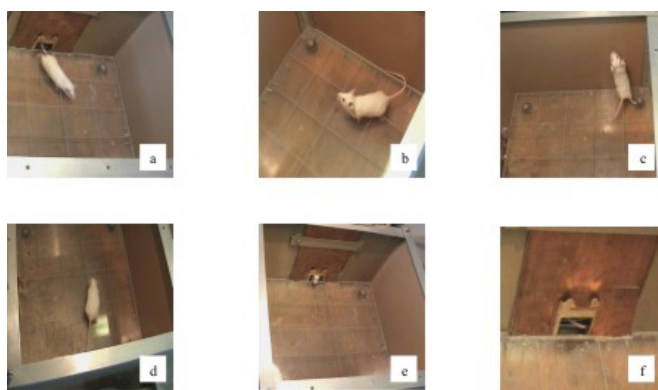
Проведенные эксперименты позволили выделить в исследуемой популяции белых мышей следующие типы поведения (табл. 1).

Таблица 1. Показатели поведения мышей в черно-белой камере

| Номера мышей | Выглядывание в светлый отсек |                    |                                | Выходы в светлый отсек |               |                           |                         |                                    | Типы поведения                                                                          |
|--------------|------------------------------|--------------------|--------------------------------|------------------------|---------------|---------------------------|-------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
|              | Латентность (сек)            | Число выглядываний | Общее время выглядываний (сек) | Латентность (сек)      | Число выходов | Число пересеченных квадр. | Вертикальная ориентация | Общее время в светлом отсеке (сек) |                                                                                         |
| М 1          | 0                            | 0                  | 0                              | 6                      | 1             | 128                       | 67                      | 294                                |  1 |
| М 2          | 11                           | 1                  | 2                              | 13                     | 2             | 122                       | 37                      | 279                                |                                                                                         |
| М 3          | 5                            | 7                  | 8                              | 23                     | 3             | 82                        | 13                      | 127                                |                                                                                         |
| М 4          | 29                           | 11                 | 43                             | 30                     | 6             | 79                        | 8                       | 210                                |                                                                                         |
| М 5          | 11                           | 24                 | 75                             | 0                      | 0             | 0                         | 0                       | 0                                  |  3 |
| М 6          | 3                            | 17                 | 33                             | 0                      | 0             | 0                         | 0                       | 0                                  |                                                                                         |
| М 7          | 25                           | 12                 | 65                             | 0                      | 0             | 0                         | 0                       | 0                                  |  4 |
| М 8          | 12                           | 15                 | 78                             | 0                      | 0             | 0                         | 0                       | 0                                  |                                                                                         |
| М 9          | 14                           | 6                  | 27                             | 0                      | 0             | 0                         | 0                       | 0                                  |                                                                                         |
| М 10         | 0                            | 0                  | 0                              | 0                      | 0             | 0                         | 0                       | 0                                  |  5 |

Как видно из таблицы, первый и пятый типы поведения характеризуются соответственно максимальной и минимальной степенью исследовательской активности в отношении новизны (светлый отсек), демонстрируя таким образом крайние варианты рассматриваемой популяции. Максимальная исследовательская активность животного характеризуется следующими проявлениями: отсутствием выглядывания из темного отсека, значительным сроком пребывания в светлом (294 с из 300), сравнительно высоким уровнем ориентировочной локомоции (число пересеченных квадратов, вертикальные стойки) (табл. М1, рис.1;а-d). Минимальная активность – пребыванием животного в темном отсеке в течение всего периода тестирования (300 с), полным отсутствием реакции выглядывания из темного отсека (табл. М10; рис.1,ф).

Анализ поведения животных в используемой модели позволяет разделить наблюдаемые типы поведения на два класса, отличающихся по степени их близости к крайним вариантам популяции. При этом в качестве операционального классификационного критерия рассматривается *переход особи в светлый отсек (с предшествующей реакцией выглядывания или без нее), сопровождаемый горизонтальной (пересечение квадратов) и вертикальной (стойки) активностью*.



**Рис. 1.** Примеры поведения мышей в ЧБК.

а-d - исследовательская активность животного в светлом отсеке,  
е – реакция выглядывания  
f - мышь, демонстрирующая минимальную активность.

По данному критерию мыши М1-М4, демонстрирующие типы поведения 1, 2 и мыши М5-М10 с типами поведения 3, 4, 5 (табл.) относятся к особям соответственно с низким и высоким уровнем базовой тревожности.

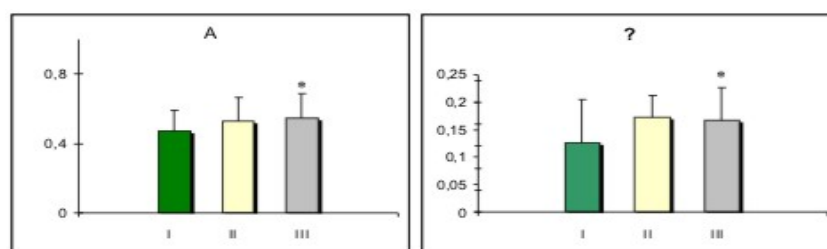
Подобное разделение животных на две крайние группы по уровню тревожности напоминает раннюю классификацию И.П. Павлова, разделившего экспериментальных собак на «смелых» и «трусливых» по степени выраженности «рефлекса биологической осторожности» [8].

Традиционно ЧБК используется для экспериментальной оценки препаратов, вызывающих тревогу (анксиогенов) и противотревожных средств (анксиолитиков) [5]. При этом тестирование животных (мыши, крысы) предполагает использование одной из двух процедур. Первая процедура - животное помещается в темный отсек с последующей регистрацией его активности, направленной на исследование светлого отсека (процедура, используемая в настоящей работе). Вторая - животное помещается в светлый отсек с регистрацией исследовательской активности и проявления норкового рефлекса – убежание в темный отсек (наиболее распространенная процедура тестирования мышей в психофармакологических исследованиях).

В литературе мы не обнаружили исследований, в которых ЧБК специально используется для типизации экспериментальных животных. Более того, мы не обнаружили и примеров использования ЧБК при исследовании психофармакологических препаратов, которым предшествует типизация подопытных животных на других поведенческих моделях. Заметим, что использование в исследованиях линейных животных не исключает наличия выраженных индивидуальных различий в поведении среди отдельных особей [1,2].

В следующей серии опытов нас интересовало, в какой мере выявленные в ЧБК различия в поведении животных обнаружатся при их тестировании в режиме ОП.

Данные относительно использования ОП для оценки индивидуальных особенностей поведения грызунов (крысы, мыши) носят противоречивый характер. Полагают, например, что тест ОП не является достаточно адекватным для этих целей [15]. С другой стороны, допускается возможность типизации животных по параметрам поведения в ОП на предмет их устойчивости к эмоциональному стрессу (формирование наркотической зависимости) [3]. Рассматривается возможность типизации на основе анализа динамики габитуации животного к условиям ОП [9].



**Рис. 2.** Показатели поведения у мышей, тестируемых в режиме ОП.

А – отношение числа пересеченных квадратов ко времени нахождения мыши в ОП (в светлом отсеке).

В – отношение числа стоек ко времени нахождения мыши в ОП (в светлом отсеке).

I – соответствующие показатели животных с низкой базовой тревожностью при тестировании в ЧБК

II – то же в ОП

III – показатели животных с высокой базовой тревожностью

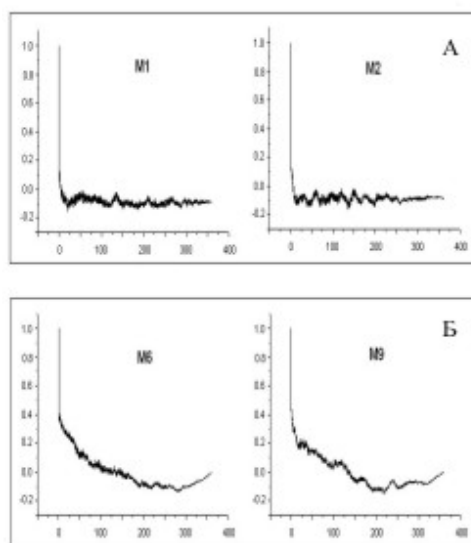
\* -  $p > 0,05$ , U- критерий, при сравнении с I и II.

Как видно из рис. 2, показатели поведения у мышей с высокой базовой тревожностью достоверно не отличаются от показателей животных с низкой тревожностью. Таким образом, индивидуальные особенности поведения животных, выявленные с помощью ЧБК, не проявляются в ситуации «навязанной» новизны (тестирование в режиме ОП). Иными словами, обсуждаемая форма тестирования (ОП) не чувствительна к предварительно классифицированным в ЧБК группам животных.

Безусловно, этот вывод не может служить достаточным основанием для исключения ОП из арсенала поведенческих моделей, используемых для оценки индивидуальных особенностей животных. Дальнейшее техническое усовершенствование модели и определенная модификация процедуры тестирования, очевидно, усилят «разрешающие» возможности данного теста.

Так, например, в последнее время типологические особенности поведения животных (крысы) исследуются в ОП в комплексе с другими поведенческими тестами с последующей обработкой всех полученных показателей методом факторного анализа [6].

В следующей серии экспериментов ставился вопрос о том, в какой мере ранее идентифицированные различия в поведении отразятся в дистанционных показателях функционального состояния животных, регистрируемых аппаратным комплексом «Биоскоп» [17].



**Рис. 3.** Нормированная корреляционная функция сигналов физиологического состояния животных, регистрируемых биоскопом.

А, Б – мыши, соответственно, с низкой и высокой базовой тревожностью.

По оси абсцисс - время в минутах, по оси ординат – значение корреляционной функции.

M1, M2, M6, M9 – номера подопытных мышей (см. таблицу).

Процедура тестирования используемой методики предполагает многочасовую регистрацию дистанционных сигналов бодрствующих животных, которые помещались в специально сконструированную камеру, ограничивающую возможность их перемещения. Это обстоятельство позволяет рассматривать сигналы «Биоскопа» как отражение изменений физиологического состояния организма, вызванного стрессорным воздействием («мягкая» форма иммобилизационного стресса).

Результаты исследования показали достаточно высокую чувствительность комплекса к указанным изменениям. Эти изменения отражались как в спектральных характеристиках дистанционных сигналов, так и в наибольшей степени их корреляционных функциях (рис. 3).

Как видно из рис.3, корреляционная функция сигналов физиологического состояния подопытных животных определенным образом отражает индивидуальные различия, предварительно выявленные в ЧБК.

Таким образом, изложенные экспериментальные данные и их анализ показали возможность оценки индивидуальных особенностей поведения лабораторных мышей с помощью теста «черно-белая камера». При этом выделены две группы особей, объединяющие животных по степени выраженности тревожности – аналога одной из личностных характеристик, которую в клинике связывают с риском возникновения невротических нарушений [7]. Продемонстрирована достаточная эффективность метода дистанционной оценки физиологического состояния животных в сочетании с традиционными медико-биологическими тестами.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Жданова И.В., Щипилова Л.С., Киреева К.Н.* Связь иерархической структуры сообщества с особенностями обучения у нелинейных белых крыс и крыс линии Dull Трайона. Журнал ВНД им. И.П.Павлова. 37, 4, с. 769-771, 1987.
2. *Карпова И.В.* Содержание дофамина, его метаболитов и ГАМК в nigro-стриарной системе у крыс с разной способностью к обучению. Журнал ВНД им. И.П.Павлова. 42, 1, с. 161-163, 1992.
3. *Коплик Е.В.* Метод определения критерия устойчивости крыс к эмоциональному стрессу. Вестник новых медицинских технологий. 9, 1, с. 16-18, 2002.
4. *Кудрявцева Н.Н.* Применение теста «перегородка» в поведенческих и фармакологических экспериментах. Росс. Физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 88, 1, с. 90-105, 2002.
5. *Латин И.П.* Модели тревоги на мышах: оценка в эксперименте и критика методики. Экспер. клин. фармакол. 63, 3, с. 58-62, 2000.
6. *Мельников А.В., Куликов М.А., Новикова М.Р., Шарова Е.В.* Выбор показателей поведенческих тестов для оценки типологических особенностей поведения крыс. Журнал ВНД им. И.П.Павлова. 54, 5, с. 712-717, 2004.
7. *Неврозы: экспериментальные и клинические исследования.* Л. Наука, 223с, 1989.
8. *Павлов И.П.* Двадцатилетний опыт объективного изучения высшей нервной деятельности (поведение) животных. -М.: Наука, 659 с, 1973.
9. *Саркисов Г.Т., Саркисян Ж.С., Коваль И.Н., Карапетян Л.М., Мадатова И.Р.* Индивидуальные особенности поведения крыс в «открытом поле» и радиально-симметричном лабиринте. //Биолог. журнал Армении. 59, 1-2, с.18-21, 2007.
10. *Саркисов Г.Т.* Субкортикальные механизмы научения и памяти в аспекте эволюционных преобразований мозга. Изд-во НАН Армении «Гитуцюн». 241 с, 2007.
11. *Саркисова К.Ю.* Связь между типами поведения, особенностями окислительного метаболизма мозга и устойчивостью к патогенным воздействиям. Докт. дисс. Москва, Ин-т ВНД и НФ РАН, 256с, 1997.
12. *Саркисян Р.Ш.* Новые аспекты функционирования биологических систем. Автореферат докт. дисс. Ереван. 46 с, 2008.
13. *Симонов П.В.* Мотивированный мозг. Москва, «Наука», 267 с, 1987.
14. *Симонов П.В.* Созидающий мозг. Москва, «Наука», 112 с, 1993.
15. *Функциональные системы организма: Руководство (под ред. К.В. Судакова).* Москва, Медицина. 432с, 1987.
16. *Belzung C., Griebel G.* Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice^ a review. //Behav. Brain Res. 125, p. 141-149, 2001.
17. *Draayer J.P., Grigoryan H.R., Sargsyan R. Sh., Ter-Grigoryan S.A.* Systems and Methods for Investigation of Living Systems. US patent Application Publication, Pub. No.; US 2007/0149866 A1. Pub. Date: Jun. 28, 2007.
18. *File S.E.* Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse// Behav. Brain Res. 125, p. 151-157, 2001.
19. *Kalueff A.V., Tuohimaa P.* The Suok («rope walking») murine test of anxiety. Brain Res. Protocols. 14, 87-99, 2005.
20. *Leonard B.E.* From animals to man: Advantages, problems and pitfalls of animal models in psychopharmacology: In: Human Psychopharmacology: Measures and Methods (V. 2), Eds I.Hindmarch, P.D.Stonier, Wiley and Sons, Chichester, New York, p. 334-345, 1989.
21. *Porsolt R.D., McArthur R.A., Lenegre A.* Psychotropic screening procedures: In: Methods in Behavioral Pharmacology, Ed. F. van Haaren, Elsevier, New York, p. 23-51, 1993.
22. *Sargisov G.T., Karapetyan L.M., Sarkisyan Zh.S., Mikaelyan Kh.M.* Extinction of a conditioned defensive reflex in cats after lesioning of the Entopeduncular Nucleus. //Neuroscience and Behavioral Physiology, New York. 32, 6, p.643-644, 2004.

Поступила 25.08.09.



Biolog. Journal of Armenia, 1 (62), 2010

## CHANGES IN PARP-1 ACTIVITY IN RAT LIVER AND THYMOCYTE NUCLEI AFTER IN VIVO ADMINISTRATION OF CISPLATIN

I.G. ARTSRUNI, K.S. MATINYAN, L.H. DEMIRKHANYAN,  
M.A. MELNIKOVA-SHAROVA, A.V. MARGARYAN,  
E.G. SARGSYAN, E.S. GEVORGYAN

Yerevan State University, Faculty of Biology  
E-mail: [gana@ysu.am](mailto:gana@ysu.am)

Cisplatin (cis-DDP)-induced modulations of activity of internuclear nick-sensor enzyme poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP1) in rat liver cell and thymocyte nuclei were examined. Changes in PARP-1 activity were detected in 48 hours intraperitoneal injection of cis-DDP (10 mg/1000 g body weight). It was shown that in 48 hours of drug treatment the PARP-1 activity in liver cell nuclei was suppressed nearly by 50%, whereas the activity of the enzyme in thymocyte nuclei was enhanced more than two-fold. Our data revealed that cis-DDP-induced modulations of PARP-1 activity in thymocyte and rat liver nuclei were not coupled with apoptotic DNA cleavage.

*Cisplatin – nuclei – DNA – PARP-1 activity*

Ուսումնասիրվել է ցիսպլատինի (cis-DDP) ազդեցությունը ներ-կորիզային նիկ-սենսորային ֆերմենտ պոլի(ԱԴՐ)-ռիբոզիլ պոլիմերազի (ՊԱՌՊ-1) ակտիվության վրա առնետի լյարդի բջիջների և թիմոցիտների կորիզներում: Cis-DDP (10 մգ/1000 գ) ներարկումից 48 ժ հետո լյարդի բջիջների կորիզներում ՊԱՌՊ-1-ի ակտիվությունը նվազում է, իսկ թիմոցիտների կորիզներում աճում ավելի քան երկու անգամ: Ցույց է տրվել, որ ՊԱՌՊ-1-ի ակտիվության փոփոխությունները թիմոցիտների և լյարդի բջիջների կորիզներում չեն գուգակցվում ԴՆԹ-ի ապոպտիկ ճեղքավորումով:

*Ցիսպլատին - կորիզ - ԴՆԹ - ՊԱՌՊ-1 ակտիվություն*

Исследовано действие терапевтических доз противоопухолевого препарата – цисплатина (cis-DDP) на активность внутриядерного ник-сенсорного фермента поли (АДФ-рибозил) полимеразы 1 (ПАРП-1) клеток печени и тимоцитов крыс.

Показано, что через 48 ч после внутрибрюшинного введения cis-DDP (10 мг/1000 г массы животного) активность фермента в ядрах тимоцитов увеличивается более чем в два раза, в то время как в ядрах клеток печени снижается на 50%. Установлено, что наблюдаемые изменения активности ПАРП-1 не сопряжены с апоптической фрагментацией ДНК.

*Цисплатин – ядра – ДНК - активность ПАРП-1*

Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) is abundant nuclear enzyme and the most elaborated member of PARP enzymes superfamily. The enzyme is implicated in regulation of chromatin structure and is indispensable in a wide range of chromatin-associated processes [11].

PARP-1 possesses activities to cleave  $\text{NAD}^+$  and transfer ADP-ribose residues from to  $\gamma$ -carboxy groups of glutamine or, in a lesser extend, to asparagine residues of target proteins including itself (processes are recognized as trans- and auto-poly(ADP-ribos)ylation respectively). These are the common types of PARP activities that account for about 99% of ADP-ribosyl polymers in the living cells. Multiple ADP-ribose units (usually 50-200) can form linear or branched polymers attached to proteins [4].

The PARP-1 activity significantly increases in the presence of single or double-strand DNA breaks and PARP-1 is defined as an effective nick sensor enzyme. PARP-1 protein dimerization is found to be a requisite for high enzymatic activity. However, the DNA-PARP-1-binding stoichiometry and further activation of the enzyme depends upon the character of DNA strand breaks [18]. Investigations comes to show that in the absence of DNA breaks and in physiological conditions the activity of PARP-1 can be modulated by non B forms of DNA e.g. Z conformation, hairpins and cruciforms [15, 21] and various physiologic cellular components [13]. High negative charge of ADP-ribose polymers is responsible for dramatic changes in conformation of acceptor chromatin-associated proteins [9]. Polyribosylation of histone H1 and other chromatin-associated proteins eventually leads to changes in chromatin architecture and activities in the adjacent chromatin regions [12, 14].

The main nuclear target proteins for PARP-1 are p53, NK-kB, histones, topoisomerases, DNA-dependent protein kinase, DNA repairing machinery proteins and endonuclease DNAS1L3 [14, 22]. Involvement of these proteins in regulation of basic nuclear functions determines the crucial role of PARP-1 in cell response to different genotoxic and cytotoxic agents (oxidizing and alkylating agents, UV and ionizing radiation). In the case of moderate DNA damage the PARP-1 activation plays a central role in acute and effective DNA repair which is essential for cell survival. In contrast, massive and unrepairable DNA damage is caused by activation of PARP-1 which lead to rapid depletion of intracellular  $\text{NAD}^+$  [20, 23]. In effort to restore NAD content the cells consume ATP. The ability of the cell to retain the ATP content on the level which is sufficient for organized destruction of intracellular structures directs the process of cell death towards apoptotic program, while the failure in ATP production lead to energetic collapse and finally to necrotic death. Thus, PARP-1 determines the choice of death-style of damaged cells in multicellular organisms and plays a role of a molecular switch between different programs of cell demise [6, 8].

In addition to well known role of PARP-1 in basic nuclear functions it was shown, that suppression of the enzymic activity sensitizes cancer cells to ionizing radiation and to a wide range of DNA damaging agents that are widely used in anticancer therapies e.g. cis-DDP, topoisomerase 1 inhibitors and DNA methylating agents [16M. Cis-DDP is one of the most effective and broad-spectrum cytotoxic anticancer drugs. However, arising resistance of cancer cells to the drug undermines its curative potential. To overcome this problem the doses of administrated cis-DDP are gradually increased which leads to manifestation of severe side effects that are originated from cytotoxic features of the drug.

The involvement of PARP-1 in processes of determining the choice of cell death pathways as well as cell surveillance requires the elucidation of mechanisms underlying regulation of PARP-1 activity in response to cytotoxic stimuli. We suppose that this strategy helps to develop new effective approaches in therapies against cancer. Thus, in present study we attempt to examine whether PARP-1 activities in liver cell and thymocyte nuclei of rats are affected after *in vivo* treatment with cisplatin.

**Material and Methods.** All the chemicals used in this study were obtained from Sigma, USA. Experiments were performed on white, outbred male rats 4-6 weeks old weighting 100-120 grams. Water solution of cis-DDP was injected intraperitoneally (0.5 and 1 mg per 100 g animal weight). Animals were decapitated in 24 and 48 hours drug injection. The nuclei of liver and thymus cells were isolated by Hewish et al [10].

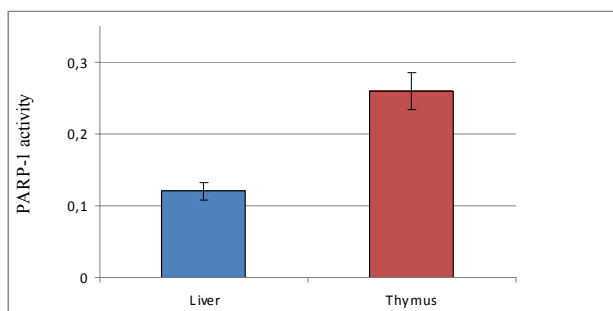
PARP-1 activity was measured by direct quantification of NAD content [19]. The assay was adapted to quantitation of NAD<sup>+</sup> consumed by isolated nuclei.

Briefly, the nuclear pellets were gently resuspended in PARP assay buffer (0,25 M sucrose, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,15 mM spermine, 0,5 mM spermidine, 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 25 mM Tris, pH 7,4). The density of nuclear suspension was normalized according to DNA content (1mg/ml). PARP reaction was initiated by addition of NAD<sup>+</sup> stock solution to nuclear suspension in PARP assay buffer to 0,5 mM NAD<sup>+</sup> final concentration. The reaction proceeded for 8 min (at 37°C) and was stopped by removal of nuclei from reaction mixture by centrifugation at 13 000 g for 2 min. The supernatants were transferred to new tubes and was aliquot (700 µl. NAD<sup>+</sup> quantification was performed in these aliquots by sequential addition of 2M KOH and 20% acetophenone (in EtOH), yielding final concentrations of KOH, acetophenone and formic acid as in original assay [19]. The PARP assay buffer which contained 0,5 mM NAD<sup>+</sup> was set as standard and its absorbance was measured at 378 nm alongside the samples derived from nuclear suspensions. The amount of NAD<sup>+</sup> present in samples of nuclear suspensions in PARP assay buffer was determined by subtraction the absorbance of test sample from the standard.

DNA preparation and electrophoresis was performed by methods described elsewhere [1].

**Results and discussion.** It is well documented that very often tumorigenesis is coupled with disability of malignant cells to undergo suicide apoptotic program. Recently a new death pathway was established which is induced by poly(ADP-ribose)polymers and is mediated by PARP-1 [17, 24]. Thus, PARP-1-mediated cell death can be enhanced at several points downstream or upstream of PARP-1 activation. Coming from this, the development of drugs that can modulate PARP-1 activity is one of promising approaches in cancer therapy. However, one should take into account that after *in vivo* drug administration the healthy cells undergo drug effects alongside with malignant ones.

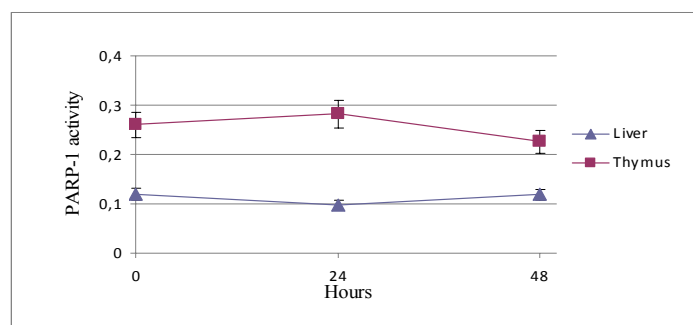
This study was devoted to the examination whether cis-DDP has an impact on PARP-1 activity of rat thymocyte and liver cells nuclei. The data shown in Fig. 1 demonstrate that initial PARP-1 activity in thymocyte nuclei is considerably higher than in liver cell nuclei. This data are in good agreement with early report [7], where the highest poly(ADP-ribosyl)ating activity was determined in extracts of reticulo-endothelial cells, thymus and secondary immune organs.



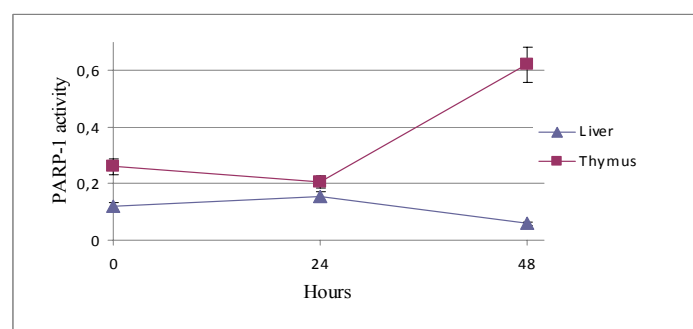
**Fig. 1.** The baseline activity of PARP-1 in liver cell and thymocyte nuclei.

It should be mentioned that the vast majority of studies devoted to cis-DDP effects were performed on different cell lines and cultures. Common exposure to drug in these experiments does not exceed 24-48 hours. Thus, in present study we examine the effect of cis-DDP on PARP-1 activity of thymocyte and liver cells nuclei after 24 and 48 hours of drug treatment of the healthy rats.

According to our data the low therapeutic dose of cisplatin (5 mg/1000 g) has no appreciable effect on PARP-1 activity in examined nuclei in 24 and 48 hours of drug administration (Fig.2).



**Fig. 2.** PARP-1 activity in liver cell and thymocyte nuclei after *in vivo* administration of 5 mg/1000 g of cisplatin



**Fig. 3.** Changes in PARP-1 activity in liver cell and thymocyte nuclei induced by 10mg/1000g cis-DDP injection

Administration of 10 mg/1000 g cis-DDP doesn't affect the activity of PARP-1 in first 24 hours. However, in further 24 hours i.e. 48 hours of drug treatment with latter dose of drug a drastic (more than two-fold) elevation of PARP-1 activity in thymocyte nuclei was detected.

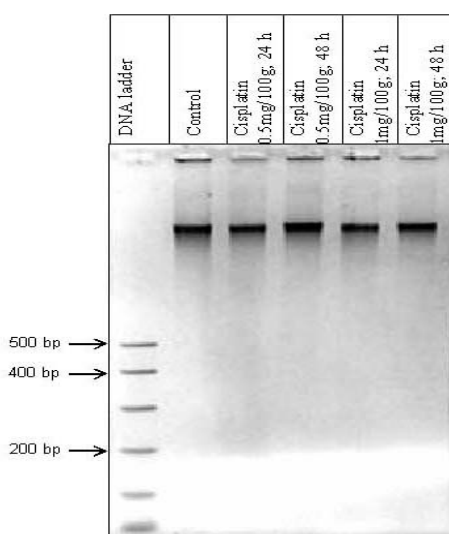
The changes of PARP-1 activity in liver cell nuclei in 24 hours of high dose cis-DDP treatment were unreliable. After 48 hours of drug administration unexpected decrease (nearly by 50%) of the enzyme activity in nuclei from liver cells was detected (the data shown in Fig.3).

Cis-DDP is recognized as highly effective anticancer drug which triggers multifactorial biochemical responses in cells. Though the mechanisms of cis-DDP cytotoxicity are complex, the binding of the drug to genomic DNA and forming of cis-DDP -DNA adducts of different types are recognized as the most prominent steps in the chain of biochemical events that occurred in the cells treated with cis-DDP. Generally, it is considered that the local lesions in DNA structure enhance PARP-1 affinity to DNA, which causes activation of the enzyme. Thus, activation of PARP-1 in thymocyte nuclei, which was detected herein, may be the result of the DNA bending or formation of kinks that were generated by cisplatin-DNA adducts. Nevertheless, our data show that *in vivo* administration of cis-DDP caused inactivation of PARP-1 in liver cell nuclei and these results seems inconsistent to previous supposal. Taking into account that though DNA damage may have significant impact on PARP-1 activity the final outcome is determined by the type of alteration [13] we consider that variations in chromatin architecture of thymocyte and liver cell nuclei can underlay this controversy.

It is documented that the variations in chromatin architecture can maintain formation of different types of cis-DDP-DNA adducts [2] Cepeda et al., 2007], which can in turn, enforce different rotational settings of DNA in nucleosomes [3]. We suppose that changes in DNA positioning enforced by cis-DDP-DNA adducts in liver cell nuclei can differ from those produced in thymocyte nuclei and may foster PARP-1 detachment from chromatin fiber which finally leads to inactivation of the enzyme.

It is well known that apoptosis is one of widely accepted measures of drug cytotoxicity. One of the most characteristic features of biochemical events that underlay execution phase of this cell-suicide program is internucleosomal DNA fragmentation and inactivation of PARP-1 via cleavage by caspase-3, -7. In present study we were interested to examine whether cisDDP-induced suppression of PARP-1 activity was coupled with DNA fragmentation in liver cell nuclei.

Our data show that *in vivo* administration of cisDDP in doses examined so far didn't cause internucleosomal DNA cleavage in the liver cell (Fig. 4) or thymocyte nuclei (the data are not shown) in 24-48 hours of the drug treatment. Taking into consideration the fact that internucleosomal DNA cleavage is the hallmark of apoptosis we can suppose that *in vivo* treatment of rats with cisDDP doesn't cause apoptosis in examined cells at least in 48 hours of drug administration.



**Fig. 4.** Rat liver nuclei DNA after *in vivo* treatment of animals with cis-DDP.

## REFERENCES

1. Արծրունի Ի.Գ., Մատինյան Կ.Ս., Մելիկյան-Շարովա Մ.Ա., Գևորգյան Է.Ս. Ինսուլինի ազդեցությունը քրոմատինի ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորման վրա առնետի լյարդի կորիզներում. Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 3, 60, էջ 6-11, 2008:
2. Cepeda V., Fuertes M.A., Castilla J., Alonso C., Quevedo c., Perez J.M. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. Anti-Cancer Agents in Medical Chemistry, 7, pp. 3-18, 2007.
3. Danford A.J, Wang D, Wang Q, Tullius T.D, Lippard S.J. Platinum anticancer drug damage enforces a particular rotational setting of DNA in nucleosomes. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 102, 35, pp. 12311-12316, 2005.
4. D'Amours D., Desnoyers S., D'Silva I., and G.G. Poirier. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. Biochem. J., 342, pp. 249-268, 1999.

5. Eguchi Y, Shimizu Sh. and Tsujimoto Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Research* 57, pp. 1835-1840, 1997.
6. Gill M. Poly(adenosine diphosphate ribose) synthesis in soluble extracts of animal organs. *The Journal of Biological Chemistry*. 247, 18, pp. 5964-5971, 1972.
7. Ha H.Ch., Snyder S.H. Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96, 24, pp. 13978-13982, 1999.
8. Hassa P.O, Haenni S.S, Elser M, Hottiger M.O. Nuclear ADP-Ribosylation Reactions in Mammalian Cells: Where are we today and where are we going? *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70, pp.789-829, 2006.
9. Hewish D.R., Burgoyne L.A. The calcium dependent endonuclease activity of isolated nuclear preparations. Relationships between its occurrence and the occurrence of other classes of enzymes found in nuclear preparations. *Biochemical and Biophysical Res. Com.* 52, 2, pp. 475-481, 1973.
10. Kim M.Y., Mauro S., Ge'vry N., Lis J.T., Kraus W.L. NAD<sup>+</sup>-dependent modulation of chromatin structure and transcription by nucleosome binding properties of PARP-1. *Cell*, 119, 6, pp. 803-814, 2004.
11. Kim M.Y., Zhang T., Kraus W.L. Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1: 'PAR-laying' NAD<sup>+</sup> into a nuclear signal. *Genes & Development*. 19, 17, pp. 1951-1967, 2005.
12. Kun E., Kirsten E., Mendeleyev J., Ordahl C.P. Regulation of the enzymatic catalysis of poly(ADP-ribose) polymerase by dsDNA, polyamines, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, histones H1 and H3 and ATP. *Biochemistry*. 45, 3, pp. 210-216, 2004.
13. Kraus W.L. Transcriptional control by PARP-1: chromatin modulation, enhancer-binding, coregulation, and insulation. *Curr Opin Cell Biol.* 20, 3, pp. 294-302, 2008.
14. Lonskaya V.N., Potaman L.S., Shlyakhtenko E.A., Oussatcheva Y.L., Lyubchenko V.A., Soldatenkov A. Regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by DNA structure-specific binding. *The Journal of Biological Chemistry*. 280, 17, pp. 17076-17083, 2005.
15. Miwa M, Masutani M. Poly(ADP-ribosyl)ation and cancer. *Cancer Sci.*, 98, 10, pp. 1528-1535, 2007.
16. Nguewa P.A., Fuertes M.A., Alonso C., Perez J.M. Pharmacological modulation of poly(ADP-ribose) polymerase-mediated cell death: exploitation in cancer chemotherapy. *Molecular Pharmacology*, 64, pp.1007-1014, 2003.
17. Pion E., Ullmann E., Amü J.-Ch., de Murcia G., Bombarda E. DNA-induced dimerization of poly(ADP-ribose) polymerase-1 triggers its activation. *Biochemistry*, 44, pp.14670-14681, 2005.
18. Putt K.S., Hergenrother P.J. An enzymatic assay for poly(ADP - ribose) polymerase-1 (PARP-1) via the chemical quantitation of NAD<sup>+</sup>: application to the high-throughput screening of small molecules as potential inhibitors. *Analytical Biochemistry*, 326, pp 78-86, 2004.
19. Virag L., Szabo C. The Therapeutic Potential of Poly (ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 54, pp. 375-429, 2002.
20. Wacker D.A, Ruhl D.D, Balagamwala E.H, Hope K.M, Zhang T, Kraus W.L. The DNA Binding and Catalytic Domains of Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 Cooperate in the Regulation of Chromatin Structure and Transcription. *Molecular and Cellular Biology*, 27, 21, pp. 7475-7485, 2007.
21. Yakovlev A.G., Wang G., Stoica B. A., Boulares H.A., Spoonde A.Y., Yoshihara K., Smulson M.E. A Role of the Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-dependent Endonuclease in Apoptosis and Its Inhibition by Poly(ADP-ribose) Polymerase. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(28), pp. 21302-21308, 2000.
22. Ying W., Alano C.C., Garnier Ph., Raymond A.S. NAD<sup>+</sup> as a metabolic link between DNA damage and cell death. *Journal of Neuroscience Research* 79, pp. 216-223, 2005.
23. Yu S-W., Andrabi Sh.A., Wang.H., Kim N.S., Poirier G.G., Dawson T.M. Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose) polymer-induced cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103, N 48, pp 18314-18319, 2006.

Received 23.06.2009



Биол. журн. Армении, 1 (62), 2010

## БИОДЕГРАДАЦИЯ ТРИАЗИНОВЫХ ГЕРБИЦИДОВ

С.Ш. ТАТИКЯН, Н.И. МКРТЧЯН, Н.В. СИМОНЯН, Г.Э. ХАЧАТРЯН

*Ереванский физический институт,  
лаборатория радиационной биофизики*

Исследована способность культур микроорганизмов из коллекции, собранной в лаборатории радиационной биофизики ЕрФИ, подвергать биodeградации триазиновые гербициды, широко используемые в сельском хозяйстве для борьбы с сорняками. Выявлен ряд штаммов, способных использовать гербициды метазин и пропазин в качестве источников углерода и азота. Исследовано влияние ряда факторов на скорость роста этих культур и деградацию пропазина. Полученные данные позволяют сделать допущение о том, что ферментативный аппарат, вовлеченный исследованными микроорганизмами в процесс деградации, различен.

*Гербицид – деградация – метазин – пропазин*

Հետազոտված է որոշ մանրէների կուլտուրաների եռազինային հերբիցիդներ քայքայելու ունակությունը: Աշխատանքներում օգտագործվել են Ռադիացիոն կենսաֆիզիկայի լաբորատորիայում ստեղծված մանրէների հավաքածուի կուլտուրաները: Հայտնաբերված են շտամներ, որոնք ընդունակ են օգտագործել մետազինը և պրոպազինը որպես ածխածնի և ազոտի աղբյուր: Ուսումնասիրված է այդ կուլտուրաների աճի և պրոպազինի քայքայման արագության կախումը մի շարք պայմաններից: Ստացված տվյալները թույլ են տալիս ենթադրել, որ այդ կուլտուրաներում հերբիցիդների քայքայումն իրականացնող ֆերմենտային ապարատները միմյանցից տարբերվում են:

*Հերբիցիդ (քայքայում) / մետազին / պրոպազին*

The capability of some cultures of microorganisms to degradate the triazine herbicides widely used in agriculture for struggling against weeds has been investigated. In the current work the collection of microorganisms created in the Laboratory of radiation biophysics of YerPhI was used. A number of strains capable to use herbicides metazine and propazine as carbon and nitrogen sources were found out. The dependence of these cultures growth rate and propazine degradation on a number of factors has been investigated. The obtained data allow making an assumption that the enzymatic system, involved in the degradation process by these microorganisms, is different.

*Herbicide – degradation – metazine – propazine*

Современное сельское хозяйство потребляет огромное количество пестицидов различной структуры и назначения. Все эти соединения более или менее длительное время остаются в почве и могут накапливаться в растениях или мигрировать на значительные расстояния вместе с грунтовыми водами. Практика показывает, что даже при строгом соблюдении технологии применения ядохимикатов невозможно предотвратить загрязнение окружающей среды, не говоря уже о таких

областях деятельности человека, как войны и химическая индустрия, где загрязнение вообще не поддается контролю. В литературе можно найти много примеров обнаружения различных пестицидов в воде и продуктах питания [2, 3, 4, 13, 15]. Очевидно, что природоохранные мероприятия не могут ограничиваться только усилением контроля за использованием ядохимикатов, но должны включать также создание и применение технологий очистки загрязненных почв и воды, а также методов экспресс-анализа степени их загрязненности. Применение микробиологических культур для этих целей является очень перспективным направлением. Такие технологии не требуют больших экономических затрат, и, будучи биосовместимыми, являются наиболее щадящими. Современные методы биотехнологии позволяют получать культуры для деградации самых разнообразных, даже химически таких стабильных соединений, как ДДТ [6, 10]. Несколько лет назад в нашей лаборатории из дикой микрофлоры были выделены два штамма *Pseudomonas sp.*, способные разрушать 2,4,6-тринитротолуол (ТНТ) [11]. Нам также удалось на протяжении нескольких лет собрать коллекцию микроорганизмов, толерантных к присутствию различных токсичных соединений.

Триазिनковые гербициды - симазин, пропазин, атразин и ряд других являются наиболее широко применяемыми гербицидами для защиты целого ряда сельскохозяйственных культур от сорняков. Например, по данным Environment Protection Agency (EPA), годовое потребление только симазина в США превышает 2 млн тонн [17].

В литературе описана микробиологическая деградация некоторых триазинковых гербицидов как отдельными культурами, так и смешанной микрофлорой. В описанных случаях деградация в основном происходит с участием анаэробных или факультативно анаэробных микроорганизмов [5,7,8,9,12]. В настоящей работе рассмотрена микробиологическая деградация гербицидов триазиновой группы некоторыми микроорганизмами родов *Pseudomonas* и *Bacillus* в аэробных условиях.

**Материал и методы:** Культуры микроорганизмов. В работе были использованы культуры микроорганизмов, в основном идентифицированных до уровня рода из коллекции культур, собранных в лаборатории радиационной биофизики ЕрФИ на протяжении многих лет в ходе выполнения проектов, связанных с исследованием окружающей среды.

Штаммы микроорганизмов выращивали на плотных агаризованных средах различного состава. В качестве основы для ростовой среды применялась солевая агаризованная минимальная среда (МС) следующего состава: агар-агар – 2%,  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  – 0,15%,  $KH_2PO_4$  – 0,05%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,02%.

В качестве объектов биodeградации были использованы коммерческие препараты пропазина и метазина.

Для выяснения способности культур подвергать гербициды (Ге) биodeградации проверяли их способность расти на МС с добавкой одного лишь гербицида, а также в комбинации с глюкозой в качестве источника углерода, или хлористым аммонием в качестве источника азота.

Посев культур на чашки Петри осуществляли двумя основными способами: стеклянным шпателем и бактериологической щеткой. Во втором случае каждая культура предварительно рассевалась шпателированием на чашки с мясопептонным бульоном, затем из отдельных колоний готовили клеточную суспензию на стерильной водопроводной воде, которая вносилась в ячейки подставки бактериологической щетки.

В наших экспериментах использовали два соединения триазиновой природы – метазин и пропазин. Так как эти соединения практически нерастворимы в воде, их растворяли в спирте и добавляли на поверхность уже готовой среды в чашках Петри, равномерно распределяя по поверхности агара стеклянным шпателем до полного испарения спирта. На поверхность чашки вносили 1 или 2 мг гербицида. На контрольные чашки добавляли такое же количество спирта. Выращивание микроорганизмов проводили при 28° в течение 5-17 дней.

В предварительной серии экспериментов интенсивность роста микроорганизмов оценивали по площади разрастания отдельных колоний, образовавшихся на месте отпечат-

ков щетки. Для этого чашки с колониями фотографировали, и эти рисунки обрабатывали с помощью инструментария обработки изображения программы MatLab, который позволяет автоматически вычерчивать контуры и определять площадь полученной кривой. У наиболее перспективных штаммов, отобранных в результате такой оценки, определяли титр.

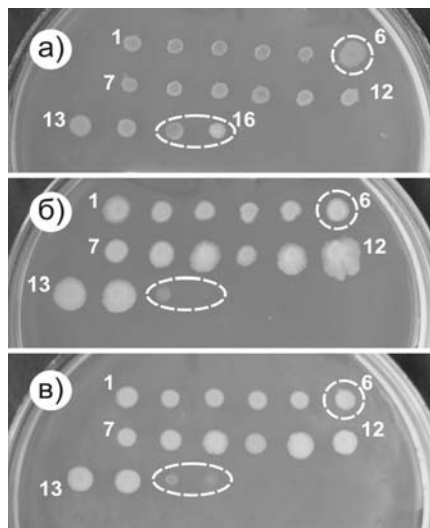
Для определения титра выросших культур, отобранных с помощью первой методики, штаммы высевали на чашки Петри газоном и выращивали на протяжении 10-15 дней в стандартных условиях. Через каждые 2-3 дня после посева из пластины агара вырезали куски одинакового размера и выросшую культуру смывали с поверхности агара фиксированным объемом водопроводной воды или буфера. Оптическую плотность клеточной суспензии определяли спектрофотометрически при длине волны 540 нм.

**Определение пропазина.** Из агаровой среды вырезали куски одинаковой площади и экстрагировали пропазин ацетоном. Содержание пропазина в экстракционной жидкости определяли тонкослойной хроматографией на пластинках Silufol. Элюцию проводили смесью ацетон-толуол в соотношении 2:1. Для проявления пятен применяли методику, описанную в ГОСТ-30349-96 [1]. Пластины опрыскивали реактивом следующего состава: 1%-ный раствор  $\text{AgNO}_3$  – 0,5 мл, водный аммиак – 0,7 мл, ацетон до 10 мл, высушивали и облучали ультрафиолетовой кварцевой лампой несколько минут, в результате чего образовывались темные серо-коричневые пятна.

**Результаты и обсуждение:** В ходе исследований, проводимых в лаборатории радиационной биофизики ЕрФИ, была собрана значительная коллекция культур микроорганизмов, которые были выделены из воды и почвы различных регионов территории республики – Ереванское озеро, Гетар, окрестности промышленных предприятий, таких как НПО «Наирит», завод химреактивов, Армянская АЭС и т.д.

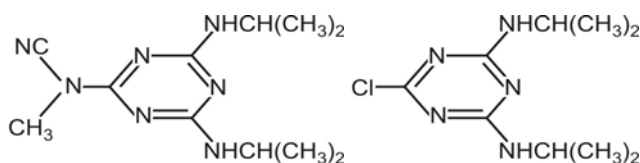
Способность культуры микроорганизмов разрушать некоторое органическое соединение, в первую очередь, предполагает толерантность этой культуры к его присутствию и способность использовать его как источник углерода или/и азота. Исходя из этого предположения, для выявления микроорганизмов, потенциально способных утилизировать метазин и пропазин, мы исследовали способность роста культур из коллекции лаборатории в присутствии этих гербицидов. В этой серии экспериментов было исследовано более 120 культур, в основном представителей родов *Pseudomonas* и *Bacillus*. Культуры выращивали на агаризованной среде (МС+Ге, МС+Ге+Гл). Кроме этого были проанализированы водные вытяжки из проб почвы, взятых в различных районах республики, на предмет наличия в ней микрофлоры, устойчивой к упомянутым гербицидам. В результате сканирования были обнаружены несколько культур, рост которых в присутствии пропазина и метазина оказался более интенсивным, чем в контрольной среде. Эти культуры микроорганизмов были отобраны для дальнейших исследований.

На рис. 1 представлены сравнительные фотографии отпечатков (бляшек), выросших при посеве исследуемых культур на чашки Петри бактериологической щеткой на 12-й день на контрольной (МС) и опытной (МС+Ге) средах. Незначительный рост культур на контрольной среде, скорее всего, обусловлен наличием органических примесей в агаре. Кроме того, известно, что некоторые культуры микроорганизмов способны размножаться даже в условиях резкой нехватки источников энергии [14]. Учитывая этот факт, а также то обстоятельство, что культуры микроорганизмов могут оказаться просто толерантными к присутствию токсичных соединений, все опыты тщательно контролировались и выполнялись в нескольких повторностях, по 2-3 параллельных посева в каждой. Следует отметить, что поведение этих культур микроорганизмов в присутствии пропазина и метазина довольно одинаково и в тех случаях, когда наличие гербицида приводит к увеличению интенсивности роста, и тогда, когда его наличие подавляет рост микроорганизмов (на рисунке обведены пунктирной линией).



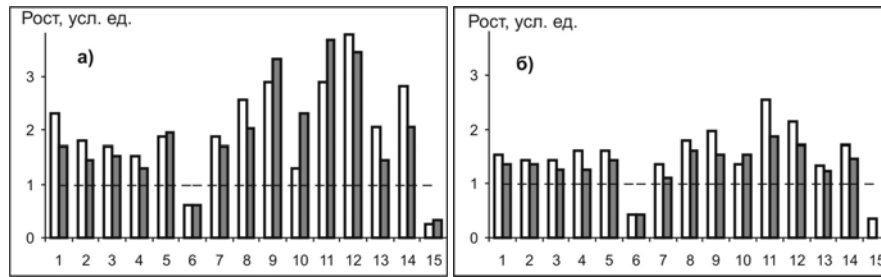
**Рис.1.** Сравнение отпечатков (бляшек) при посеве культур на чашки Петри бактериологической щеткой на минимальную среду (МС – а) и на среду, содержащую метазин (б) и пропазин (в).

Учитывая то, что эти соединения являются близкими аналогами, такая картина вполне закономерна (рис.2).



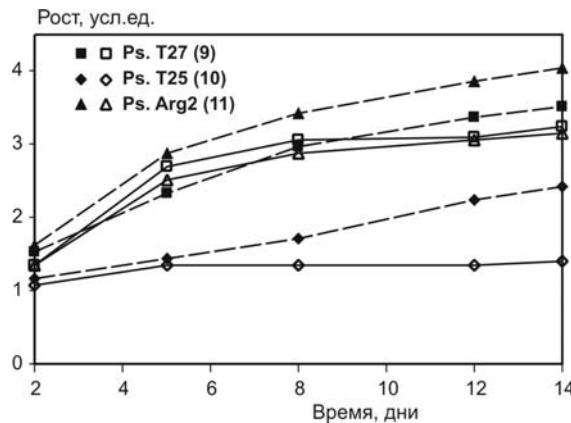
**Рис.2.** Структурные формулы метазина (слева) и пропазина (справа).

Однако и в поведении отдельных культур наблюдаются значительные различия при исследовании влияния концентрации гербицидов на рост микроорганизмов. Это хорошо видно на приведенной ниже гистограмме, где представлена интенсивность роста культур микроорганизмов в присутствии различных концентраций метазина и пропазина. Повышение концентрации метазина в культуральной среде приводит к заметному повышению интенсивности роста нескольких культур (например №№ 9-11: здесь и далее приводятся просто порядковые номера бляшек). Остальные культуры, хотя и проявляют некоторое угнетение роста, тем не менее, по сравнению с контролем, растут значительно интенсивнее (за исключением культур №№ 6,15,16). Конечно, эти культуры в дальнейших исследованиях не использовались, и здесь представлены только для иллюстрации отрицательного влияния ядохимикатов на почвенную микрофлору. В среде с добавкой пропазина только для одной культуры повышение концентрации гербицида приводит к увеличению интенсивности роста. Примечательно, что эта культура интенсивнее растет также в присутствии более высокой концентрации метазина, а у тех же культур №№ 6, 15, 16 наблюдается угнетение роста. Как видно из рис.1, № 16 практически не растет в присутствии гербицида, а у № 15 при высокой концентрации наблюдается лишь незначительный рост.



**Рис. 3.** Влияние различных концентраций метазина (а) и пропазина (б) на рост некоторых культур. Светлые столбики – низкая концентрация, темные – высокая.  
Для каждого отдельного случая интенсивность роста культуры на контрольной среде принята за единицу (пунктирная линия).  
Номера соответствуют номерам колоний на рис.1.

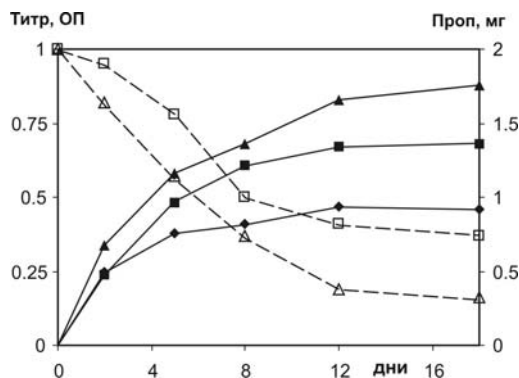
На рис. 4 представлена динамика роста некоторых культур в присутствии различных концентраций метазина. Здесь представлены те культуры, которые положительно реагируют на увеличение концентрации гербицида. На наш взгляд, очень перспективным может оказаться штамм *Pseudomonas sp.* T25 (№ 10 на гистограмме).



**Рис. 4.** Динамика роста некоторых штаммов микроорганизмов в присутствии низкой (сплошные линии) и высокой (пунктирные линии) концентрации метазина. Номера в скобках соответствуют номерам на рис.1. Рост контроля в каждой точке принят за единицу.

В течение первых 5 дней скорость роста штамма Т 25 практически одинакова при разных концентрациях метазина, однако в дальнейшем рост их культуры при высокой концентрации происходит значительно интенсивнее. Можно предположить, что в данном случае наблюдается хорошо известное явление индукции, когда под воздействием определенного соединения происходит активация соответствующего ферментативного аппарата. Добавление в среду глюкозы в концентрации до 0,3% или хлорида аммония (0,1%) практически не приводила к дополнительной интенсификации роста (данные не представлены).

На рис. 5 представлены изменение титра микроорганизмов и количества пропазина в среде при выращивании нескольких культур рода *Pseudomonas*. Это культуры №№ 9-11 на гистограмме.



**Рис. 5.** Изменение титра (сплошные линии) и количества пропазина в среде роста (пунктирные линии). Культуры и обозначения те же, что на рис. 4.

Из рисунка видно, что рост микроорганизмов сопровождается эффективным уменьшением количества введенного пропазина. Учитывая, что это соединение богато не только углеродом, но и азотом (5 атомов азота в молекуле), можно предположить, что пропазин служит источником как углерода, так и азота. К сожалению, отсутствие достаточно чувствительных доступных методик определения метазина на данном этапе работ не позволило получить достоверные данные об изменении его количества в ходе выращивания культур микроорганизмов. Отметим, что методика, использованная для определения пропазина, является высокочувствительной, но основана на наличии хлора в составе определяемой молекулы.

Мы пока не исследовали пути и продукты деградации этих гербицидов. Ниже приводится хорошо известный в литературе путь деградации триазиновых гербицидов, который протекает до распада кольца и образования  $\text{CO}_2$  и  $\text{NH}_3$  (рис. 6.) с участием почвенной микрофлоры [16]. Эта схема деградации — общая для многих соединений триазиновой группы, где, в частности, аммелин и циануриновая кислота являются промежуточными продуктами распада.



**Рис. 6.** Биодеградация триазиновых гербицидов. На схеме представлены только некоторые этапы.

Можно предположить, что наблюдаемая нами деградация метазина и пропазина также происходит аналогичным путем, однако детальное исследование процесса деградации является предметом дальнейшего исследования. Исследована способность роста ряда микроорганизмов родов *Pseudomonas* и *Bacillus* на средах, содержащих триазиновые гербициды.

Выявлены несколько культур, которые не только толерантны к этим соединениям, но способны также подвергнуть их частичной или полной деградации. Исследовано влияние ростовой среды на особенности роста некоторых микроорганизмов. Показано, что эти культуры по-разному реагируют на природу и концентрацию гербицида, что позволяет предположить наличие у них различного ферментативного аппарата, вовлеченного в процесс биodeградации.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Межгосударственный стандарт ГОСТ 30349-96 "Плоды, овощи и продукты их переработки. Методы определения остаточных количеств хлорорганических пестицидов". М., Изд-во стандартов, 1997.
2. Эйхлер В., Яды в нашей пище, М., "Мир", 1986.
3. *Alle A., Dembelle A., Yao B. and Ado G.* Distribution of Organochlorine Pesticides in Human Breast Milk and Adipose Tissue from Two Locations in Cote d'Ivoire. *Asian Journal of Applied Sciences* 2, 456-463, 2009.
4. *Ahmad S., Zia-Ul-Haq M., Imran M. et al.* Determination of Residual Contents of Pesticides in Rice Crop from Different Regions of Pakistan. *Pak. J. Bot.*, 40, 3, 1253-1257, 2008.
5. *Cook, A.M.* Biodegradation of s-triazine xenobiotics. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 46, 93-116, 1987.
6. *Corona-Cruz A., Gold-Bouchot G., Gutierrez-Rojas M., Monroy-Hermosillo O. and Favela E.* Anaerobic-Aerobic Biodegradation of DDT (Dichlorodiphenyl Trichloroethane) in Soils. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 63, 2, 219-225, 1999.
7. *Crowford, J.J.; Sims, G.K.; Mulvaney, R.L.; Radosevich, M.* Biodegradation of atrazine under denitrifying conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 49, 5, 618-623, 1998.
8. *Ghosh P. K., Philip L., and Bandyopadhyay M. J.* Anaerobic Treatment of Atrazine Bearing Wastewater. *Environ. Sci. Health*, B36, 3, 301-316 2001.
9. *Jessee, J.A., Benoit R.A., Hendricks A.C., Allen G.C., Neal J.L.* Anaerobic degradation of cyanuric acid, cystein, and atrazine by a facultative anaerobic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45, 97-102, 1983.
10. *Kamanavalli Ch.M. and Ninnekar H.Z.* Biodegradation of DDT by a Pseudomonas Species. *Current Microbiology*, 48, 1, pp. 10-13, 2004.
11. *Khachatryan G.E., Mkrtchyan N.I., Simonyan N.V., Khachatryan T.V., Tatikyan S.Sh.* Two Unidentified Aerobic Bacterial Strains That Transform 2,4,6-Trinitrotoluene. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 16, 393-395, 2000.
12. *Mandelbaum R.T., Wackett, L.P., and Allan, D.L.* Mineralization of the s-triazine ring of atrazine by stable bacterial mixed cultures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 6, 1695-1701, 1993.
13. Mohapatra S. P., Kumar M., Gajbhiye V. T. 1 and Agnihotri N. P. Ground water contamination by organochlorine insecticide residues in a rural area in the indo-gangetic plain. *Environmental Monitoring and Assessment*, 35, 2, 155-164, 1995.
14. *Myasnik M., Safiyazov Zh., Akhmedova D., and Simonyan N.* Growth Patterns of E.Coli in Saline., *Studia Biophys.*, 17, 55-62, 1969.
15. *Oleszek W., Terelak H., Maliszewska-Kordybach B., Kukula S.* Soil, Food and Agroproduct Contamination Monitoring in Poland. *Polish Journal of Environmental Studies*, 12, 3, 261-268, 2003.
16. *Scribner E., Thurman E.M., Zimmerman L.R.* Analysis of Selected Herbicide Metabolites in Surface and Ground Water of the United States. *The Science of the Total Environment*, 248, 2, 157-167, 2000.
17. [http://www.epa.gov/safewater/contaminants/dw\\_contamfs/simazine.html](http://www.epa.gov/safewater/contaminants/dw_contamfs/simazine.html)

Поступила 04.09.2009.



Биол. журн. Армении, 1 (62), 2010

## ПЛОДЫ ШИПОВНИКА ПОЛУШАРОВИДНОГО (*ROSA HAEMISPHERICA*) КАК СЫРЬЕ ДЛЯ ПЕРЕРАБОТКИ

А.Н. АМИРБЕКЯН

Институт ботаники НАН РА

Рост и урожайность шиповника полушаровидного (*Rosa haemisphaerica*) стимулируются в сравнительно сухих лесных условиях. Содержание в плодах сухих веществ, сахаров, витамина С, каротиноидов выше в полупустынях и аридных редколесьях. Содержание этих веществ в консервированных плодах уменьшается на 29-58 %. Предлагается использовать указанный вид в аридных условиях в целях получения плодов и охраны природы.

*Шиповник полушаровидный - дендрометрические показатели -  
лесорастительный район - химический состав - переработка*

Գիսագնդաձև մաւրենու (*Rosa haemisphaerica*) աճը և բերքատվությունը խթանվում են համեմատաբար չոր անտառային պայմաններում: Պտուղներում չոր նյութերի, շաքարների, վիտամին C(ի, կարոտինոիդների պարունակությունը բարձր է կիսաանապատներում և արիդային նոսր անտառներում: Պահածոյացված պտուղներում այդ միացությունների քանակը նվազում է 29-58%: Առաջարկվում է նշված տեսակն օգտագործել արիդային պայմաններում՝ պտուղների բերք ստանալու և բնապահպանական նպատակով:

*Գիսագնդաձև մաւրենի (դենդրոմետրիկ ցուցանիշներ /  
անտառբուսական շրջան (քիմիական կազմ) / վերամշակում*

*Rosa haemisphaerica* growth and productivity are stimulated in comparatively dry forest conditions. Contents of dry matters, sugars, vitamin C, carotinoides in fruits increase in hemideserts and arid rareforests. In tinned fruits the quantity of these substances are decreasing by 29-58 %. The use of this species in arid conditions for fruit yield and nature guard purpose is suggested.

*Rosa haemisphaerica – dendrometric indexes – woodvegetation district –  
chemical structure – foodprocessing*

Флора Армении богата полезными растениями, которые используются в пищевых, медицинских, технических и других целях. Среди этих растений следует отметить представителя семейства Розоцветных (Rosaceae) шиповник полушаровидный (*Rosa haemisphaerica* Herzm.) (рис.1). Это кустарник высотой 1-2 м, листья одиночные, перистосложные, с прилистниками, которые обычно сростаются с черешком листа. Листочки обратнойцевидные, в основании клиновидные. Цветы одиночные, венчик состоит из пяти обратносердцевидных лепестков. Тычинки в большом количестве соединены с гипантием. Гипантий шаровидный, мясистый, без шипов, от оранжевого до красного цвета.

Сведения о распространении в природе ш. полушаровидного были получены в середине прошлого века [8, 10]. Был исследован также химический состав

некоторых видов шиповников Армении, однако остался без внимания ш. полушаровидный [9].



**Рис. 1.** Шиповник полушаровидный: фаза созревания плодов

В наших прежних исследованиях было обращено внимание на дендрометрические показатели, устойчивость к внешним воздействиям, урожайность и химический состав плодов этого вида [3]. Однако эти работы велись только в полупустынном лесорастительном районе (ЛРР). Между тем, благодаря своей экологической пластичности, этот вид произрастает также в других лесорастительных районах Армении, что требует исследования отмеченных показателей в условиях последних. Принимая во внимание это обстоятельство, нами были проведены сравнительные исследования этих показателей в отличающихся друг от друга почвенно-климатическими условиями трех ЛРР Армении.

**Материал и методика:** Объект исследования произрастает в полупустынном (окрестности Еревана), сравнительно сухом лесном (Ехегнадзор) ЛРР, а также в районе полупустынных редколесий (Гарни), природные условия которых описаны ранее [5]. После созревания плодов определяли их химический состав: содержание витамина С по Мурри, сахаров – по Бертрану, органических кислот – по яблочной кислоте [4].

**Результаты и обсуждение.** Результаты исследований показали, что климатические условия ЛРР существенно влияют на дендрометрические показатели ш. полушаровидного (табл. 1).

**Таблица 1.** Некоторые дендрометрические показатели ш. полушаровидного в разных ЛРР (средние данные 2-х лет)

| Показатели                           | ЛРР           |                                    |                           |
|--------------------------------------|---------------|------------------------------------|---------------------------|
|                                      | Полупустынный | Полупустынные и аридные редколесья | Сравнительно сухой лесной |
| Высота куста, м                      | 2,17          | 1,98                               | 2,26                      |
| Проективное покрытие, м <sup>2</sup> | 2,06          | 1,64                               | 2,70                      |
| Оси                                  |               |                                    |                           |
| а) количество                        | 12,4          | 15,1                               | 11,9                      |
| б) высота, м                         | 1,80          | 1,49                               | 1,96                      |
| в) диаметр, мм                       | 12,2          | 1,11                               | 12,5                      |

Как видно из данных табл.1, дендрометрические показатели полупустынного и сравнительно сухого лесного ЛРР мало отличаются. В этих условиях они образуют более высокие, но с малочисленными осями кусты.

В полупустынном ЛРР и аридном редколесье картина обратная: значительно увеличивается число осей, но уменьшается их высота и диаметр. Этот факт показывает, что высота местопроизрастания приводит к действию механизмов

компенсационного роста, которое осуществляется количественным увеличением осей и сокращением вертикального роста.

На основе полученных данных можно заключить, что в росте ш. Полушаровидного проявляется его ответная реакция на условия местопрорастания, что отражается также на урожайности и химическом составе плодов (табл. 2).

Выяснилось, что наибольшая урожайность одного куста обеспечивается в сравнительно сухом лесном ЛРР, а наименьшая – в полупустынном ЛРР и ЛРР аридного редколесья. Однако при пересчете на единицу проекции кустов картина урожайности меняется. В этом случае преимущество на стороне кустов, выросших в полупустынном районе, в то время как в относительно сухом лесном ЛРР зарегистрированы самые низкие результаты. Это обстоятельство обусловлено проективным покрытием кустов, которое больше в сравнительно сухом лесном и меньше – в полупустынном районе и аридных редколесьях.

**Таблица 2.** Урожайность и химический состав плодов Ш. полушаровидного в разных ЛРР (ср. данные 2-х лет)

| Показатели                  | ЛРР           |                                  |                           |
|-----------------------------|---------------|----------------------------------|---------------------------|
|                             | Полупустынный | Полупустыни и аридные редколесья | Сравнительно сухой лесной |
| Урожайность, г *            | 820,3/398,2   | 564,4/344,1                      | 921,8/341,4               |
| Сухие вещества, %           | 18,34         | 21,39                            | 18,42                     |
| Сахара, %                   | 12,50         | 13,41                            | 11,54                     |
| Органические кислоты, %     | 1,36          | 1,19                             | 1,50                      |
| Витамин С, мг / %           | 225,94        | 268,40                           | 214,50                    |
| Сахарокислотный коэффициент | 9,19          | 11,27                            | 7,69                      |

*\*) в числителе на один куст, знаменателе - на 1 м<sup>2</sup> проективного покрытия куста.*

Из табл. 2 очевидно, что условия произрастания отразились на химическом составе плодов. Плоды ш. полушаровидного, выросшего в полупустынном и сравнительно сухом лесном ЛРР, мало различались по количественным показателям выявленных веществ. Эти различия более выражены, с одной стороны, у последних, и с другой – между плодами, полученными в полупустынном и аридном ЛРР.

Примечательно высокое содержание сахаров и витамина С в плодах ш. полушаровидного, выросшего в полупустынном ЛРР и в районе аридного редколесья. В этом отношении известно, что высокое содержание витамина С свидетельствует о стимуляции обмена веществ и действия приспособительных механизмов растений в напряженных условиях [7]. На основе литературных данных и полученных нами результатов можно утверждать, что в районе полупустынь и аридных редколесий, по сравнению с двумя другими ЛРР, растения находятся в более напряженных условиях факторов среды, что и приводит к вышеописанной картине химического состава плодов ш. полушаровидного.

Одним из основных пищевкусовых показателей плодов является сахарокислотный коэффициент [2]. В наших исследованиях этот показатель был высоким в районе полупустынь и аридных редколесий и низким – в сравнительно сухом ЛРР. Следовательно, климатические условия первого больше благоприятствуют развитию более качественных в химическом отношении плодов.

Известно, что из плодов шиповника готовят разнообразные ценные напитки, варенья, джемы, кисели и т.д. [6].

Известно также, что свежие плоды шиповника съедобны и имеют высокие пищевкусовые качества, но мы подвергли их переработке. Приготовили джем, сок, компот, варенье и пюре. Все они имеют приятный вид и вкус.

С целью выявления изменений химического состава отмеченных продуктов в процессе консервирования мы подвергли плоды термической обработке с сохранением технологических сроков и соотношения использованной воды и сырья. Оказалось, что в обработанных плодах содержание исследованных веществ уменьшилось, %: сухих веществ – на 40-45, сахаров – на 52-58, органических кислот – на 29-32, витамина С – на 36-41. Это обстоятельство обусловлено как переходом этих соединений в раствор, так и процессами частичного разложения. Причем в случае полученных процентных данных неоспоримо, что обработанные плоды растений из разных ЛРР содержат разное количество отмеченных веществ.

Обобщая вышеизложенное, считаем, что ш. полушаровидный достоин большого внимания. Исходя из высокой приспособленности, нетребовательности к почве и экологической пластичности, необходимо расширение его площадей, в особенности за счет сухих, каменистых, непригодных к использованию земель. Это будет способствовать озеленению этих территорий, получению высококачественного урожая и одновременно обеспечит противоэрозионную, почвозащитную и водоудерживающую функцию насаждений. Качественный и обильный урожай может решить ряд производственных и социальных проблем.

### ЛИТЕРАТУРА

1. *Ունգոլիս* *Լ.Վ., Չիշոյան Ն.Բ.* Ֆարմալոգիկա: Երևան, էջ 92-97, 2000:
2. *Гавюк Л.А., Прохорова Л.М., Корлэтяну Н.А.* Сахарокислотный индекс как показатель качества и лежкоспособности плодов. Тез. докл. Всес. конф. “Теоретическая и прикладная карпология”, Кишинев, “Штиинца”, с. 246, 1989.
3. *Давтян В.А., Амирбекян А.Н.* Изменение роста и урожайности некоторых ценных кустарников в зависимости от условий произрастания. В кн.: Актуальные проблемы ботаники в Армении. Матер. междунар. конфер. Ереван, Изд с. 242-245, 2008.
4. *Ермаков А.И., Арасимович В.В., Смирнова-Иконникова М.И., Мурри И.К.* Методы биохимического исследования растений. М.-Л., Сельхозгиз, 520 с., 1952.
5. *Казарян В.О., Арутюнян Л.В., Хуришудян П.А., Григорян А.А., Барсегян А.М.* Научные основы облесения и озеленения Армянской ССР. Ереван, Изд. АН Арм.ССР, 348 с., 1974.
6. *Кошечев А.К.* Дикорастущие съедобные растения в нашем питании. Москва, “Пищевая промышленность”, 255 с., 1980.
7. *Плешков Б.П.* Биохимия сельскохозяйственных растений. М., “Колос”, 496 с., 1975.
8. Флора Армении, 3, Ереван, Изд. АН Арм. ССР, с. 189-216, 1958.
9. *Чайлахян М.Х.* Содержание витамина С в шиповниках Армении. Изв. Арм. Филиала АН ССР, сер. 2, N 1, с. 75-81, 1943.
10. *Яковлева Г.П., Блиновой К.Ф.* Растения для нас. Справочное издание. Изд. “Учебная книга”, С. 596-599, 1996.
11. *Ярошенко П.Д.* Новый вид розы из Армении. Докл. АН Арм ССР, 2, 4, с.115-118, 1945.

Поступила 24.06.2009.



Биол. журн. Армении, 1 (62), 2010

## ВЛИЯНИЕ БАЗИЛИКА ЛИМОННОГО (*OCIMUM BASILICUM* L) НА РЕГУЛЯЦИЮ ТЕМПЕРАТУРНОГО ГОМЕОСТАЗА ОРГАНИЗМА КРЫС

Х.О. НАГАПЕТАН, Р.А. АРУТЮНЯН, М.А. БАБАХАНИЯН,  
Л.Э. ОГАНЕСЯН, Л.В.НУРБЕКЯН, З.И. МАРЧЕНКО

Институт физиологии им. акад. Л.А.Орбели НАН РА,  
Институт проблем гидропоники им. акад. Г.С.Давтяна НАН РА

Показано, что введение в организм экспериментальных крыс настоя базилика лимонного, выращенного гидропоническим методом, благодаря большому содержанию йода (от 2, 6 до 6,4 мг/100 г сухого вещества), способствует регуляции физических и химических механизмов терморегуляции, особенно при его сочетанном применении с омагниченной водой.

*Базилик лимонный □ омагниченная вода □ терморегуляция*

Ցույց է տրվել, որ հիդրոպոնային մեթոդով աճեցված կիտրոնային ռեհանի թուրմի ներմուծումը փորձնական առնետների օրգանիզմ, շնորհիվ լողի մեծ քանակի պարունակության (2,6-6,4 մգ/100 գր չոր նյութում), նպաստում է օրգանիզմի ջերմային հոմեոստազի ֆիզիկական և քիմիական մեխանիզմների կարգավորմանը, հատկապես մագնիսացված ջրի հետ համակցված կիրառման դեպքում:

*Կիտրոնային ռեհան ( մագնիսացված ջուր / ջերմակարգավորում*

It has been shown that administration of Lemon *Ocimum basilicum* in the organism of rats, which is grown by hydroponic method, promotes physical and chemical thermoregulatory mechanisms in rats, particularly under its combined use with magnetized water, owing to the big content of Iodine (2,6 – 4,6 mg/100 g dried material).

*Lemon Ocimum basilicum □ magnetizing water □ thermoregulation*

Базилик обыкновенный (*Ocimum basilicum* L) - однолетнее растение семейства губоцветных (*Labiata*), который в медицинской практике применяется как возбуждающее средство при угнетении ЦНС, ослаблении функции дыхания и нарушении кровообращения, а также как общеукрепляющее средство, что объясняется содержанием в нем камфоры и др. эфирных масел [5, 9]. В медицинской практике применяются и другие виды базилика - базилик мятолистный (*O. menthaefolium* Hochst) и эвгеньальный (*O. gratissimum*) [2, 6].

В условиях Армении и Арцаха в открытом грунте и гидропоническим методом выращивается новая разновидность базилика – базилик лимонный (*O.basilicum* L. v. citrali) [3]. В наших предыдущих работах впервые было показано положительное влияние *O. basilicum* L. v. citrali на функционирование сердечно-сосудистой системы у крыс как в норме, так и при воздействии эмоционально-звукового стрессорного фактора [7], а также протекторное действие

на вызванную активность пирамидных нейронов 4-го слоя коры мозга крыс [5], положительное влияние на раневой процесс при лечении гнойных ран [8].

В настоящей работе представлены результаты изучения влияния выращенного в Арцахе гидропонным методом базилика лимонного (*O. basilikum* L. v. *citrali*), а также омагниченной воды на температурный гомеостаз у крыс как в отдельности, так и при их сочетанном применении.

**Материал и методика:** Опыты проводили на 12 белых крысах – самцах, массой 250-270 г, в четырех сериях, по 3 животных в каждой. Крысы первой серии, которым для питья давали обычную питьевую воду, служили контролем. Крысы второй серии вместо обычной воды поили 10%-ным настоем базилика лимонного (НБЛ), третьей – омагниченным настоем базилика лимонного (ОНБЛ), а четвертой – только омагниченной водой (ОВ). Животные всех серий содержались в одинаковом температурном режиме и одинаковых условиях кормления.

После адаптации животных к условиям эксперимента проводили регистрацию температурных показателей «ядра» (желудочно-кишечного тракта и скелетных мышц) и «оболочки» (периферических артериальных сосудов) организма. Регистрацию температурных показателей проводили на 12-канальном стационарном потенциометре типа ЭПП-09-МЗ, подключенном к выходу фотоэлектрического усилителя типа Ф-116/2 с чувствительностью 0,013°. Для регистрации температуры желудочно-кишечного тракта как показателя несократительного термогенеза химической терморегуляции рабочие спай медно-константановой термопары вводили в ободочную кишку на глубину 5-6 см, а для регистрации сократительного термогенеза химической терморегуляции рабочие спай с помощью инъекционной иглы вводили в толщу бедренных мышц на глубину 1,5-2 см. Температуру периферических артериальных сосудов, как показателя радиационно-конвекционной теплоотдачи физической терморегуляции, измеряли с поверхности хвостовой артерии, служащей хорошим теплообменником между организмом и внешней средой.

**Результаты и обсуждение.** Результаты экспериментов показывают, что у контрольной группы крыс (получавших обычную воду) средняя температура ободочной кишки составляла 36,95°, скелетных мышц – 36,08°, а хвостовой артерии – 29,95°.

У крыс, получавших НБЛ, наблюдалось активирование как сократительного, так и несократительного термогенеза, что приводило к некоторому повышению температуры как «ядра» (ободочной кишки и скелетных мышц), так и «оболочки» (периферических артериальных сосудов). Так, если средняя температура ободочной кишки у контрольной группы крыс равнялась 36,95°, то у крыс, получавших НБЛ, она повышалась на 0,28° и доходила до 37,23°. Под воздействием НБЛ отмечалось повышение температуры и в скелетных мышцах в среднем на 1,0°, где она доходила до 37,08°, тогда как при контроле она составляла 36,08°. Повышение температуры при применении НБЛ отмечалось также в периферических подкожных сосудах, и она составляла в среднем 30,80° при 29,95° в контроле, т.е. отмечалось повышение температуры хвостовой артерии на 0,85°.

Результаты третьей серии экспериментов показали, что при приеме животными ОНБЛ наблюдается некоторое ослабление гипертермического воздействия базилика лимонного, по сравнению с НБЛ. Так, температура желудочно-кишечного тракта при приеме ОНБЛ повышалась на 0,22° и составляла 37,17°, против 0,28° при приеме НБЛ, где она составляла 37,23°. Близкие результаты получены и в отношении температурных отклонений скелетных мышц. Если при НБЛ температура скелетных мышц возросла на 1,0°, то при даче ОНБЛ она составляла всего 0,07° и в среднем доходила до 36,15°. При применении ОНБЛ температура периферических артериальных сосудов была на уровне температуры НБЛ.

Результаты опытов четвертой серии (у крыс, получавших ОВ) показали, что при применении только ОВ также активируются как физические, так и химические механизмы терморегуляции, поддерживающие температурный гомеостаз организма, но менее интенсивно, чем при НБЛ. При этом температура желудочно-кишечного тракта и скелетных мышц, по сравнению с данными у крыс, получавших ПВ, повышалась, соответственно, на  $0,24^{\circ}$  (в среднем  $37,19^{\circ}$  при ОВ и  $36,95^{\circ}$  при ПВ) и на  $0,12^{\circ}$  (в среднем  $36,15^{\circ}$  при ОВ и  $36,08^{\circ}$  при ПВ). Температура периферических артериальных сосудов при даче ОВ повышалась на  $0,29^{\circ}$  (в среднем  $30,24^{\circ}$  при ОВ и  $29,95^{\circ}$  при ПВ).

Обсуждая полученные результаты, можно полагать, что гипертермический эффект базилика лимонного связан с тем, что этот фитопрепарат действует как на физические, так и на химические механизмы терморегуляции, повышая обмен веществ и теплопродукцию как в висцеральных, так и в соматических органах, где в период основного обмена образуется 10 и 25% тепла от общего теплообразования в организме [1,4].

В свете полученных данных становится очевидным, что ОВ частично ослабляет гипертермическое воздействие базилика лимонного, что связано с активацией механизмов физической терморегуляции и увеличением радиационно-конвекционной теплоотдачи.

Таблица 1. Физические и химические терморегуляторные показатели у крыс, получавших ПВ, НБЛ,ОНБЛ и ОВ

| Исследуемый орган              | Воздействующий фактор           | Средняя температура, $^{\circ}\text{C}$ | Температурные колебания        |
|--------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------|
|                                | Питьевая вода                   | 36,95                                   | 36,93-36,97; $\square t +0,04$ |
| Ободочная кишка                | Настой базилика Л.              | 37,23                                   | 37,16-37,33; $\square t +0,07$ |
|                                | Омагниченный настой базилика Л. | 37,17                                   | 37,13-37,21; $\square t +0,08$ |
|                                | Омагниченная вода               | 37,19                                   | 37,09-37,30; $\square t +0,21$ |
|                                | Питьевая вода                   | 36,08                                   | 36,00-36,16; $\square t +0,16$ |
| Скелетные мышцы                | Настой базилика Л.              | 37,08                                   | 36,91-37,25; $\square t +0,34$ |
|                                | Омагниченный настой базилика Л. | 36,15                                   | 36,00-36,29; $\square t +0,29$ |
|                                | Омагниченная вода               | 36,2                                    | 35,9-36,30; $\square t +0,20$  |
| Периферич. артериальные сосуды | Питьевая вода                   | 29,95                                   | 29,68-30,23; $\square t +0,55$ |
|                                | Настой базилика Л.              | 30,8                                    | 30,21-31,00; $\square t +0,8$  |
|                                | Омагниченный настой базилика Л. | 30,88                                   | 30,78-30,97; $\square t +0,19$ |
|                                | Омагниченная вода               | 30,24                                   | 29,68-30,80; $\square t +1,12$ |

## ЛИТЕРАТУРА

1. Арутюнян К.Р., Нагапетян Х.О., Арутюнян Р.А., Мартиросян С.Ш. Влияние симпатолитика аминазина и симнатомиметика кофеина на температурный гомеостаз у крыс. Биолог. журн. Армении, 58, 1-2, с.76-79, 2006.
2. Арутюнян Л.В., Арутюнян А.А. Фитотерапия. Ереван, Айастан, 4, с.161-163 (на армянском языке), 2001.
3. Бабаханян М.А., Аствацатрян Н.З., Матинян Л.А., Нагапетян Х.О. Оганесян Л.Э., Марченко З.И., Московян Д.Х. Гидропонная фитотехнология – один из методов решения проблемы обогащения биомассы эпидемическими элементами в НКР. Вестник МАНЭБ, 10, 5, с. 31-36, 2005.
4. Иванов К.П. Физиология терморегуляции. Л., Наука, с.470, 1984.

5. Матинян Л.А., Бабаханян М.А., Нагапетян Х.О., Киприян Т.К., Хачатрян Т.С., Авакян А.Э. Влияние базилика лимонного на вызванную активность пирамидных нейронов коры головного мозга. Вестник МАНЭБ, 13, 4, вып.1, с. 183-186, 2008.
6. Мяткова В.Д., Степанов Ю.С. Применение базилика мятолистного при заболеваниях органов дыхания. Журн. здоровье. 2, с. 23-26, 2004.
7. Нагапетян Х.О., Бабаханян М.А., Матинян Л.А., Григорян Ш.В., Никогосян Т.Г., Арутюнян А.З., Нурбемян Л.В. Влияние базилика лимонного (*Ocimum basilikum L. v. citrol*) на функциональное состояние сердечно-сосудистой системы у крыс в норме и при стрессе. Биолог. журн. Армении, 60, 1-2, с.125-129, 2008.
8. Панев И., Цепков Е. Применение экстракта базилика для заживления гнойных ран. Болгарский мед.ж. 3, 23, с. 22-29, 2006.
9. Соколов С.Я., Замотаев И.П. Справочник по лекарственным растениям (фитотерапия), М., Медицина, 443 с, 1984.

Поступила 02.09.2009.



Biolog. Journal of Armenia, 1 (62), 2010

## SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS OF THE COMPLEMENT SYSTEM C1Q PROTEIN IN SCHIZOPHRENIA

R. ZAKHARYAN

*Institute of Molecular Biology NAS RA*

Schizophrenia is a complex, multifactor psychiatric disorder. Our previous findings indicated that altered functional activity of the complement system, a major mediator of the immune response, is implicated in the pathogenesis of schizophrenia. In the present study single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the complement C1q component were investigated in schizophrenia-affected subjects. For this purpose 103 schizophrenics and 105 healthy controls were genotyped for C1q four SNPs (C1qA rs292001, C1qB rs913243, rs291982 and rs631090) using PCR-SSP and Real-time PCR methods. The data obtained indicate no association of C1qA rs292001, C1qB: rs913243, rs631090 polymorphisms with schizophrenia whereas the carriers of the C1qB rs291982\*T mutant allele were significantly less frequent in patients when compared to control (62% vs 78%,  $p_{nominal}=0.012$ ,  $OR=0.456$ , 95%CI: 0.53-0.91,  $p_{corrected}=0.048$ ). The results of the present study suggest the association of C1qB rs291982 polymorphism with schizophrenia.

*C1q – complement system – schizophrenia – single nucleotide polymorphisms*

Շիզոֆրենիան բարդ, բազմագործոն բնույթի հոգեկան հիվանդություն է: Մեր նախորդ հետազոտությունների արդյունքները վկայում են, որ շիզոֆրենիան զուգակցվում է իմունային պատասխանի կարևորագույն միջնորդի՝ կոմպլեմենտի համակարգի ֆունկցիոնալ ակտիվության խախտմամբ: Տվյալ աշխատանքում ուսումնասիրվել են կոմպլեմենտի C1q բաղադրիչը կոդավորող գենի եզակի նուկլեոտիդային պոլիմորֆիզմները (ԵՆՊ) շիզոֆրենիայով հիվանդների մոտ: Այս նպատակով 103 շիզոֆրենիայով հիվանդների և 105 առողջ անձանց ԴՆԹ-ի նմուշները գենատիպավորվել են C1q-ի չորս ԵՆՊ-երի համար (C1qA: rs292001, C1qB: rs913243, rs291982 և rs631090)՝ կիրառելով PCR-SSP և Real-time PCR մեթոդները: Համաձայն ստացված տվյալների՝ C1qA rs292001, C1qB: rs913243 և rs631090 ԵՆՊ-երն ասոցիացված չէին շիզոֆրենիայի հետ, մինչդեռ C1qB rs291982\*T մուտանտ ալելի կրողների քանակը զգալիորեն քիչ էր հիվանդների մոտ՝ առողջ անձանց համեմատությամբ (62% vs 78%,  $p_{nominal}=0.012$ ,  $OR=0.456$ , 95%CI: 0.53-0.91,  $p_{corrected}=0.048$ ): Տվյալ հետազոտության արդյունքները վկայում են, որ C1qB rs291982 պոլիմորֆիզմը ասոցիացված է շիզոֆրենիայի հետ:

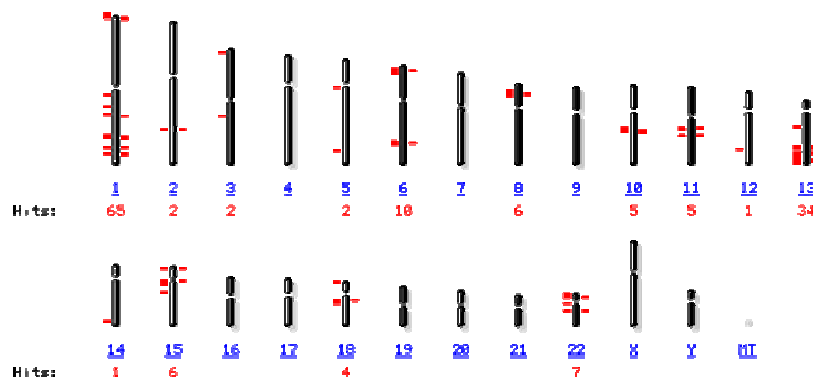
*C1q (կոմպլեմենտի համակարգ (շիզոֆրենիա (եզակի  
նուկլեոտիդային պոլիմորֆիզմներ*

Шизофрения является комплексным психическим заболеванием многофакторной природы. Результаты наших предыдущих исследований свидетельствуют о том, что шизофрения сопровождается нарушением функциональной активности важнейшего медиатора иммунного ответа – системы комплемента. В данной работе исследованы единичные нуклеотидные полиморфизмы (ЕНП) C1q компоненты комплемента у больных шизофренией. С

этой целью образцы ДНК 103-х больных шизофренией и 105-ти здоровых лиц были генотипированы по четырем ЕНП C1q (C1qA: rs292001, C1qB: rs913243, rs291982 и rs631090) с помощью методов PCR-SSP и Real-time PCR. Согласно полученным данным, C1qA rs292001, C1qB: rs913243, rs631090 полиморфизмы не ассоциировали с шизофренией, тогда как носителей C1qB rs291982\*Т мутантной алели среди больных было значительно меньше, чем среди здоровых лиц (62% vs 78%,  $p_{\text{nominal}}=0.012$ ,  $OR=0.456$ , 95%CI: 0.53-0.91,  $p_{\text{corrected}}=0.048$ ). Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что C1qB rs291982 полиморфизм ассоциирует с шизофренией.

*C1q – система комплемента – шизофрения – единичные нуклеотидные полиморфизмы*

Schizophrenia is a complex and severe psychiatric disorder (ICD 10 code: F20), manifested by a disruption in cognition and emotion along with negative (avolition, alogia, apathy, poor social functioning) and positive (hallucinations, delusions) symptoms [20]. According to the neurodevelopmental theory, the etiology of schizophrenia may involve pathological processes before the brain approaches its adult anatomical state. These processes are induced by environmental factors and result in both genetic and congenital abnormalities. They in their turn lead to disfunction of specific neural networks that would account for premorbid signs and symptoms observed in individuals that later develop schizophrenia [reviewed in 7]. Evidence from genetic studies suggest a high degree of heritability of schizophrenia and point to a number of potential candidate genes (Fig. 1) that may be perturbed early in development leading ultimately to the development of psychotic symptoms [reviewed in 2, 7, 10]. However, the molecular etiopathomechanisms of this disorder are still unclear.



**Fig. 1.** Schizophrenia gene linkage map [21].

Candidate genes are indicated by horizontal lines; number of candidate genes is indicated under chromosome serial number.

Recent studies performed in our laboratory indicate the crucial role of the alterations in the immune system state in schizophrenia and provide evidence on the implication of the alterations in the major mediator of the immune response, the complement system, in pathogenesis of this disorder [3, 4, 8, 12-16]. In particular, increased levels of the complement system C1q protein, initiator of the complement classical cascade, in schizophrenia-affected subjects has been found [8, 13]. This finding is of special interest accounting for a positive linkage of schizophrenia with chromosome 1p31 loci located nearby C1q gene (1p36.12) [9, 17]. To explore whether this alterations are genetically determined or not, in the present study we evaluated the possible association between susceptibility to schizophrenia and C1q gene variants in

Armenian population, by focusing on four single nucleotide polymorphisms (SNPs) frequent in European population. This is the first study investigating association of C1q polymorphisms with schizophrenia.

**Material and Methods. Study population.** In total, 208 unrelated Caucasian individuals of Armenian nationality living in Armenia (103 schizophrenic patients and 105 healthy individuals) were enrolled in this study. All patients (mean age $\pm$ SD was 46 $\pm$ 9.88 years) were diagnosed as paranoid schizophrenics (F20.0) according to the ICD-10 criteria [20] by two independent experienced psychiatrists. The affected subjects were recruited from the Nubarashen and Nork Clinics of Psychiatric Medical Center MH RA. Healthy volunteers (mean age $\pm$ SD was 37 $\pm$ 11.32) without family history of schizophrenia, recruited from the Erebouni Medical Center MH RA, served as reference control population samples. All individuals gave their informed consents to provide 5 ml of venous blood. This study was approved by the Ethical Committee of the Institute of Molecular Biology NAS RA.

**Methods. Genomic DNA extraction.** Genomic DNA samples were isolated from fresh blood according to the standard phenol-chloroform method [18] and stored at -30°C until further use.

**Genotyping analysis.** All DNA samples were genotyped for *C1q* four SNPs, namely *C1qA* rs292001, *C1qB*: rs913243, rs291982 and rs631090. *C1qA* rs292001, *C1qB* rs291982 and rs631090 SNPs were screened by polymerase chain reaction with sequence-specific primers (PCR-SSP) under the conditions described elsewhere [5]. All primers for PCR-SSP were designed using the genomic sequences in the GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, GeneID:712, 713). The primer sequences for three SNPs were: 1) rs292001: allele G, reverse 5'GAT GCC CGG ATG CAA ATT AC, allele A, reverse 5'GAT GCC CGG ATG CAA ATT AT, constant forward 5'AGG CTT CAG AGA CTC ACA TTC; 2) rs291982: allele G, reverse 5'ACC TTT GCC CAG ATC CAA ATG, allele T, reverse 5'ACC TTT GCC CAG ATC CAA ATT, constant forward 5'AGC CAC AAG TCC CAA TGA GA; 3) rs631090: allele T, forward 5'CAC GGA TCT CTT ACC ATT AAA T, allele C, forward 5'CAC GGA TCT CTT ACC ATT AAA C, constant reverse 5'CAT CTG TGA AAT GGG GAT GAA. The presence/absence of allele-specific amplicons in the genotyping products was visualized by 2% agarose gel stained with ethidium bromide fluorescence in reference to a molecular weight marker. Genotypes for *C1qB* rs913243G/T SNP were determined using TaqMan SNP genotyping assay (Applied Biosystems, Assay ID C\_3176751\_10) according to the manufacturer's instructions. Randomly selected samples (n=21; 10% of total) were amplified twice to check for confidence of genotyping, and in each case complete concordance was obtained.

**Data analysis.** The distributions of genotypes for all investigated SNPs were checked for correspondence to the Hardy-Weinberg (H-W) equilibrium. To find potential relevance of targeted *C1q* SNPs to schizophrenia, their allelic (gene) and phenotype frequencies (carriage rates) in patients and control groups were compared. The calculations of allelic and phenotype frequencies were based on the observed number of genotypes. Haplotype analysis and the extent of genetic association or linkage disequilibrium (LD) between different loci on specific chromosome were estimated as described earlier [22]. Maximum-likelihood (ML) haplotype frequencies in patients and control groups were estimated using an expectation-maximization (EM) algorithm [6]. The significance of differences between allele and phenotype frequencies in both groups was determined using Pearson's Chi-square test. The odds ratio (OR), 95% confidence interval (CI), and Pearson's p-value were calculated. Statistical power of the present study was calculated according to the protocol described elsewhere [11]. P values were adjusted by Bonferroni multiple correction approach, and those less than 0.05 were considered statistically significant. Data analysis was performed by the use of SNP analyzer [22] and SPSS (SPSS Inc, USA) softwares.

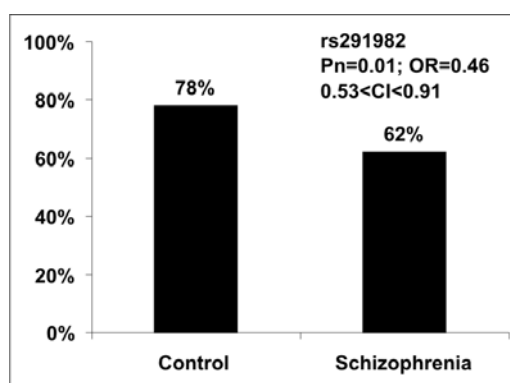
**Results and Discussion.** To determine whether four selected polymorphisms in the *C1q* gene are associated with schizophrenia, the DNA samples of patients with schizophrenia and ethnically matched individuals from control group were genotyped. The genotype distributions of studied SNPs in *both patients and control groups were in Hardy-Weinberg equilibrium*. Statistical power of the present study, indicating the differences in the carriage of the *C1q* rs291982\*T allele between the patients and healthy controls for the odds ratios (OR) 1.5 and 2, was 93.7% and 56.1%, respectively.

**Table 1.** Distribution of C1q genotypes and carriage rates of C1q minor alleles for four investigated SNPs in patients with schizophrenia (SCZ) and healthy controls.

| SNP ID          | Genotype 1 | Genotype 2 | Genotype 3         | Allele 1   | Allele 2           | Carriage           |
|-----------------|------------|------------|--------------------|------------|--------------------|--------------------|
| rs292001        | GG         | GA         | AA                 | G          | A                  | A                  |
| SCZ             | 36 (0.35)  | 57 (0.55)  | 10 (0.10)          | 129 (0.63) | 77 (0.37)          | 65 (0.65)          |
| Control         | 26 (0.25)  | 61 (0.58)  | 18 (0.17)          | 113 (0.54) | 97 (0.46)          | 79 (0.75)          |
| <i>p</i> -value |            |            | 0.116 <sup>a</sup> |            | 0.069 <sup>b</sup> | 0.108 <sup>c</sup> |
| rs913243        | GG         | GT         | TT                 | G          | T                  | T                  |
| SCZ             | 32 (0.31)  | 52 (0.50)  | 19 (0.18)          | 116 (0.56) | 90 (0.44)          | 71 (0.69)          |
| Control         | 30 (0.30)  | 57 (0.57)  | 13 (0.13)          | 125 (0.60) | 85 (0.40)          | 72 (0.69)          |
| <i>p</i> -value |            |            | 0.282 <sup>a</sup> |            | 0.510 <sup>b</sup> | 0.955 <sup>c</sup> |
| rs291982        | GG         | GT         | TT                 | G          | T                  | T                  |
| SCZ             | 39 (0.38)  | 42 (0.41)  | 22 (0.21)          | 120 (0.58) | 86 (0.42)          | 64 (0.62)          |
| Control         | 23 (0.22)  | 57 (0.54)  | 25 (0.24)          | 103 (0.49) | 107 (0.51)         | 82 (0.78)          |
| <i>p</i> -value |            |            | 0.673 <sup>a</sup> |            | 0.059 <sup>b</sup> | 0.012 <sup>c</sup> |
| rs631090        | TT         | TC         | CC                 | T          | C                  | C                  |
| SCZ             | 69 (0.67)  | 31 (0.30)  | 3 (0.03)           | 169 (0.82) | 37 (0.18)          | 34 (0.33)          |
| Control         | 78 (0.74)  | 25 (0.24)  | 2 (0.02)           | 181 (0.86) | 29 (0.14)          | 27 (0.26)          |
| <i>p</i> -value |            |            | 0.641 <sup>a</sup> |            | 0.246 <sup>b</sup> | 0.248 <sup>c</sup> |

The data are presented as absolute numbers along with proportions. a) *p*-values for comparison of Allele 2 carriage (phenotype frequency) between SCZ patients and control subjects; b) *p*-values for comparison of Allele 2 proportion (allelic frequency) between SCZ patients and control subjects; c) *p*-values for comparison of Genotype 3 proportion (versus other genotypes) between SCZ patients and control subjects.

The frequencies of all studied C1q variants in schizophrenia patients and control subjects are shown in Table 1. C1qA rs292001, C1qB rs913243, rs631090 variants were equally represented both in schizophrenics and controls. By contrast, the carriers of the C1qB rs291982\*T mutant were significantly less frequent in patients with schizophrenia when compared with control groups (62% vs 78%, *p*<sub>nominal</sub>=0.012, OR=0.456, 95%CI: 0.53-0.91).



**Fig. 2.** Proportion (%) of C1qB rs291982\*T mutant allele carriers (phenotype frequency) in patients with schizophrenia and healthy controls. *P*<sub>nominal</sub>=0.012 (*p*<sub>corrected</sub><0.05), OR=0.46, 95% CI= 0.53-0.91.

In Fig. 2 the carriers of C1qB rs291982\*T mutant allele are represented. The p-value for comparison of mutant allele carriers remained significant after Bonferonni correction for the number of loci ( $p_{\text{corrected}}=0.048$ ). P-value for comparison of C1qB rs291982\*T mutant allele frequencies was moderately significant (41% in patients vs 51% in controls,  $p_{\text{nominal}}=0.059$ ) only before Bonferonni correction ( $p_{\text{corrected}}=0.24$ ). These results suggest that the C1qB rs291982\*T mutant allele might be protective for schizophrenia patients. In other words, the wild rs291982G allele might be considered as a risk factor for schizophrenia at least in Armenian population.

To confirm the association revealed and to estimate the ML haplotype frequencies, the haplotype analysis was performed. In total, 13 haplotypes in each group of study subjects were estimated. Interestingly, haplotype comparison between patients and healthy controls revealed four haplotypes, namely, G-T-G-T ( $p_{\text{nominal}}=0.004$ ,  $p_{\text{corrected}}=0.056$ ), A-G-T-T ( $p_{\text{nominal}}=0.005$ ,  $p_{\text{corrected}}=0.07$ ), G-G-G-C ( $p_{\text{nominal}}=0.009$ ,  $p_{\text{corrected}}=0.13$ ) and A-T-T-T ( $p_{\text{nominal}}=0.048$ ,  $p_{\text{corrected}}=0.67$ ), only one of which (G-T-G-T) remained moderately significant after the correction for the number of haplotypes (in total, 13 haplotypes). The SNP comparison analysis confirmed association of C1qB rs291982 variant with schizophrenia detected in this study.

There are limited data on functionality of the C1qB rs291982 polymorphism. In order to explore possible functional role of this genetic variant, the web server FASTSNP [23] was used for identification of the functional effects of SNPs. C1qB rs291982 SNP is an intronic enhancer (alters a binding site of a transcription factor in an intronic region). The C1qB rs291982 wild G allele contains binding site of HFH-2 transcription factor, which is absent in the mutant allele. While these types of functional effects have low phenotypic risk [19], our finding might indicate the functionality of C1qB rs291982 SNP since the enhancer is transcription-stimulating DNA regulatory element [1].

Finally, the present study is the first investigation concerning the association of C1q genetic variants with schizophrenia, and reveals the negative association of C1qB rs291982 SNP with susceptibility to schizophrenia in Armenian population. In addition, the results of this study provide evidence that alterations in the complement classical pathway in schizophrenia are genetically determined.

### Acknowledgements

The author express her gratitude to the administration and medical staff of Psychiatric Medical Center (Nork and Nubarashen clinics) and Erebouni Medical Center MH RA, performing diagnostics of the patients and examination of healthy individuals involved in the study, and providing blood samples of these subjects; to the head and scientific staff of the Laboratory of Immunogenomics and Proteomics of the Medical Faculty of Palacky University (Czech Republic) and to the scientific staff of the Laboratory of Macromolecular Complexes of the Institute of Molecular Biology NAS RA for technical support, assistance and help provided during the implementation of this study.

### REFERENCES

1. *Arnosti D.N., Kulkarni M.M.* Transcriptional enhancers: Intelligent enhanceosomes or flexible billboards? *J Cell Biochem*, 94, 890-898, 2005.
2. *Baron M.* Genetics of schizophrenia and the new millennium: progress and pitfalls. *Am J Hum Genet*, 68, 2, 299-312, 2001.
3. *Boyajyan A., Khoyetsyan A., Chavushyan A.* Alternative complement pathway in schizophrenia. *Neurochem Res*, DOI 10.1007/s11064-010-0126-2, 2010.
4. *Boyajyan A., Khoyetsyan A., Tsakanova G., Sim R.B.* Cryoglobulins as indicators of upregulated immune response in schizophrenia. *Clin Biochem*, 41, 6, 355-360, 2008.

5. Bunce M, O'Neil C.M., Barnado M.C., Krausa P, Browning M.J., Morris P.J., Welsh K.I. Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB3, DRB4, DRB5&DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens*, 46, 355-367, 1995.
6. Excoffier L, Slatkin M. Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. *Mol Biol Evol*, 12, 921-927, 1995.
7. Fatemi S. H., Folsom T.D. The Neurodevelopmental Hypothesis of Schizophrenia, Revisited. *Schizophr Bull*, 35, 3, 528-548, 2009.
8. Hakobyan S., Boyajyan A., Sim R.B. Classical pathway complement activity in schizophrenia. *Neurosci Lett*, 374, 1, 35-37, 2005.
9. Holliday E.G., Nyholt D.R., Tirupati S. et al. Strong evidence for a novel schizophrenia risk locus on chromosome 1p31.1 in homogeneous pedigrees from Tamil Nadu, India. *Am J Psychiatry*, 166, 206-215, 2009.
10. Holmans P.A., Riley B., Pulver A.E. et al. Genomewide linkage scan of schizophrenia in a large multicenter pedigree sample using single nucleotide polymorphisms. *Mol Psychiatry*, 14, 8, 786-795, 2009.
11. Lalouel J.M., Rohrwasser A. Power and replication in case-control studies. *Am J Hypertens*, 15, 201, 2002.
12. Mailian K.R., Boiadzhian A.S., Sogoian A.F., Sim R.B., Manukian L.A. Concentration and protein composition of circulating immune complexes in the blood of patients with schizophrenia and subjects with positive familial history of disease. *Zhurnal Nevrologii i Psikhiatrii imeni S. S. Korsakova (Moscow)*, 105, 4, 55-60, 2005.
13. Mayilyan K.R., Arnold J.N., Presanis J.S., Soghoyan A.F., Sim R.B. Increased complement classical and mannan-binding lectin pathway activities in schizophrenia. *Neurosci Lett*, 404, 336-41, 2006.
14. Mayilyan K.R., Dodds A.W., Boyajyan A.S., Soghoyan A.F., Sim R.B. Complement C4B protein in schizophrenia. *The World Journal of Biological Psychiatry*, 9, 3, 225-230, 2008.
15. Mayilyan K.R., Weinberger D.R. Involvement of the HLA genetic diversity in schizophrenia: supporting data and perspectives. *ASHI Quarterly*, 32, 3, 74-77, 2008.
16. Mayilyan K.R., Weinberger D.R., Sim R.B. The complement system in schizophrenia. *Drug News Perspect*, 21, 4, 200-210, 2008.
17. Numata S., Ueno S., Iga J. et al. Positive association of the PDE4B gene with schizophrenia in the Japanese population. *J Psychiatr Res*, 43, 7-12, 2008.
18. Sambrook J., Russell D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 8.1-8.91, 2001.
19. Tabor H.K., Risch N.J., Myers R.M. Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nat Rev Genet*, 3, 391-397, 2002.
20. The International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems. Edition: 10, World Health Organization, Geneva, pp. 1243, 1992.
21. The National Center for Biotechnology Information. NCBI map viewer: schizophrenia, [www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map\\_search.cgi?taxid=9606&query=schizophrenia](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid=9606&query=schizophrenia), 2010.
22. Yoo J, Seo B, Kim Y. SNPAnalyzer: a web-based integrated workbench for single-nucleotide polymorphism analysis. *Nucleic Acids Res*, 33, W483-488, 2005.
23. Yuan H.Y., Chiou J.J., Tseng W.H. et al. FASTSNP: an always up-to-date and extendable service for SNP function analysis and prioritization. *Nucleic Acids Res*, 34, W635-W641, 2006.

Received 25.02.2010.



## ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ АЗОТНОГО ОБМЕНА РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ ЕРЕВАНА

А.А. ОГАНЕСЯН, Г.С. НЕРСИСЯН

*Центр эколого-ноосферных исследований НАН РА*

Изучались особенности азотного обмена в листьях растений в условиях Еревана. Выявлено, что накопление азота в растениях зависит от видовых особенностей, фазы вегетации, степени загрязненности территории произрастания. Обнаружено увеличение содержания азота в растениях в зонах сильного загрязнения, причем у устойчивых сортов за счет увеличения количества белковой формы. Показано, что количественные изменения содержания форм азота могут служить критериями как для устойчивости вида, так и степени загрязнения исследуемой территории.

*Азот – растения – вид – устойчивость – загрязнение территории*

Ուսումնասիրվել են ազոտի նյութափոխանակության առանձնահատկությունները բույսերի տերևներում Երևանի պայմաններում: Բացահայտվել է, որ բույսերում ազոտի կուտակումը կախված է տեսակային առանձնահատկություններից, վեգետացիոն փուլերից, տարածքի աղտոտվածության աստիճանից: Խիստ աղտոտված գոտիներում հայտնաբերվել է ազոտի պարունակության բարձրացում բույսերում, ընդ որում կայուն տեսակների մոտ ի հաշիվ սպիտակուցային ազոտի: Ցույց է տրված, որ ազոտի ձևերի քանակական փոփոխությունները կարող են չափանիշ հանդիսանալ ինչպես բույսերի տեսակների կայունության, այնպես էլ տարածքի աղտոտվածության աստիճանի որոշման համար:

*Ազոտ - բույսեր - տեսակներ - կայունություն - տարածքի աղտոտում*

The study covered peculiarities of nitric metabolism in the leaves of plants under conditions of Yerevan city. Nitrogen accumulation in plants depends on peculiarities of the species and the level of site pollution. On severely polluted sites nitrogen contents in plants increase; particularly in tolerant species – due to increasing protein forms. The article indicates that quantity variations of the contents of nitrogen forms can serve as criteria for both tolerance of species and the study site pollution level.

*Nitrogen – plants – species – tolerance – site pollution*

В городских условиях растения подвергаются постоянному техногенному воздействию. Автотранспорт, промышленные крупные и мелкие предприятия, коммунальное хозяйство, теплоэлектростанции, строительство являются источниками непрекращающегося потока различных токсикантов в окружающую среду. На загрязнение почвы, воды, атмосферы особенно чутко реагируют растения на различных уровнях своей организации, что фиксируется по видимым (морфологическим, физиологическим) и невидимым (нарушения метаболизма) признакам. Высокая чувствительность растений к внешним воздействиям позволяет использовать параметры их жизнедеятельности в качестве индикаторов состояния среды,

а исследования их стрессового метаболизма дает возможность выявить также физиолого-биохимические критерии ранней диагностики повреждения растений в техногенной среде [2, 9, 10].

В метаболизме растений важную роль играет азотный обмен, интенсивность и направленность которого зависит, в первую очередь, от биологических особенностей растений, почвенно-климатических условий, экологической пластичности видов и стадий онтогенеза. Обнаружены некоторые различия в азотном обмене у устойчивых и неустойчивых к загрязнению окружающей среды видов растений [4, 8].

Целью данной работы было выявление особенностей азотного обмена растений в условиях Еревана. Для этого было необходимо решить следующие основные задачи:

- определить содержание общего, белкового и небелкового азота в растениях, произрастающих в различных районах города;
- изучить сезонную и годовую динамику содержания азота в разных видах растений;
- выявить количественные различия в содержаниях общего, белкового и небелкового форм азота в растениях в зависимости от видовых особенностей и степени загрязненности территории произрастания;
- обнаружить возможные критерии для определения экологической устойчивости видов в условиях Еревана.

**Материал и методика:** Отбор проб листьев растений проводили в начале (май) и конце (ноябрь) вегетации в течение 2005-2006 гг. в 20-ти различных точках г. Еревана. Объектами исследований были наиболее распространенные в городе виды деревьев: робиния лжеакация - *Robinia pseudoacacia* L., ясень обыкновенный - *Fraxinus excelsior* L., тополь белый - *Populus alba* L., вяз мелколистный - *Ulmus foliacea* L., шелковица белая - *Morus alba* L., виноград культурный - *Vitis vinifera* L. Содержание общего, белкового и небелкового азота определяли в воздушно-сухом растительном материале по экспресс методике с помощью реактива Несслера [5]. Полученные данные подвергали компьютерной статистической обработке (Statistica 6.0), а их сравнение проводили с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмана [3].

**Результаты и обсуждение:** Как показали предыдущие исследования, в почвах Еревана среднее содержание азота в исследуемый период составляли 0,28-0,29%, а максимальное – 0,40-0,45% [1].

Результаты наших исследований выявили, что в листьях деревьев, произрастающих в городе, среднее содержание азота варьировало в пределах 1,16-2,4%, причем во всех исследуемых точках содержание общего азота в основном было на том же уровне. Наибольшие концентрации элемента накапливали листья робинии лжеакация и шелковицы белой. Средние концентрации азота в листьях шелковицы белой составляли 1,31-2,4%, а максимальные – 1,76-2,76%, а у робинии лжеакация – 1,48-2,50 и 1,88-2,74% соответственно (табл. 1).

**Таблица 1.** Содержание азота в листьях различных видов деревьев, %

| Вид                                               | Мин.      | Макс.     | Среднее   |
|---------------------------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| Шелковица белая ( <i>Morus alba</i> )             | 0.82-1.84 | 1.76-2.76 | 1.31-2.41 |
| Робиния лжеакация ( <i>Robinia pseudoacacia</i> ) | 1.22-1.91 | 1.88-2.74 | 1.48-2.50 |
| Ясень обыкновенный ( <i>Fraxinus excelsior</i> )  | 0.74-1.55 | 1.87-2.46 | 1.16-2.01 |
| Тополь белый ( <i>Populus alba</i> )              | 0.82-1.68 | 2.02-2.52 | 1.36-2.04 |
| Виноград культурный ( <i>Vitis vinifera</i> )     | 0.97-1.52 | 1.93-2.71 | 1.29-2.19 |

Робиния лжеакация является азотфиксирующим декоративным видом, а шелковица белая – представитель плодовых деревьев, однако часто встречается в насаждениях улиц. Одновременно оба вида являются газопылеустойчивыми и хорошо растут в условиях города.

Изучение сезонной динамики содержаний азота выявило накопление его в растениях в начале вегетации, что вполне закономерно. Сравнительный анализ полученных за 2 года данных показал явное увеличение содержания азота в растениях в 2006 году (рис. 1).

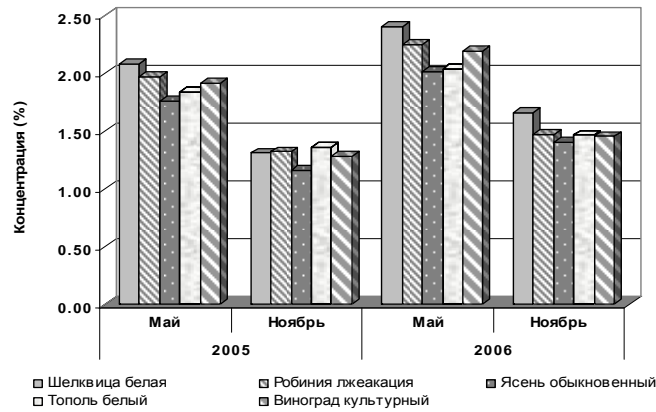


Рис.1. Динамика среднего содержания азота в листьях деревьев.

Все вышесказанное было подтверждено коэффициентом ранговой корреляции Спирмана при статистической обработке данных (рис.2).

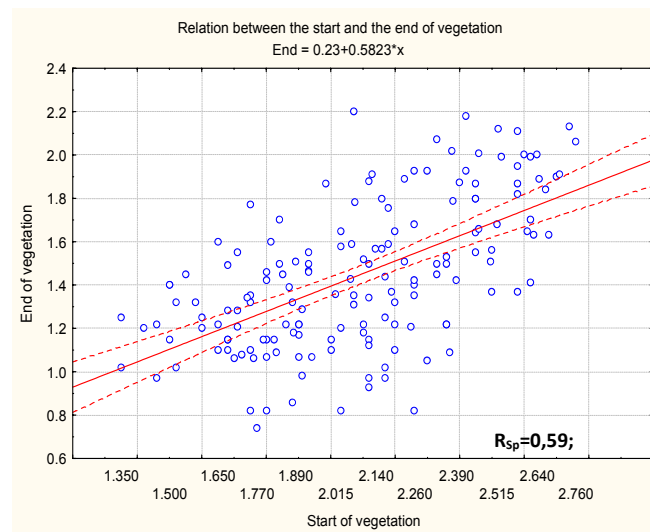


Рис.2. Корреляционный анализ данных

С целью выявления особенностей азотного обмена растений в городских условиях и возможного влияния на него загрязненности окружающей среды нами были изучены концентрации общего, белкового и небелкового азота в листьях растений, произрастающих в зонах сильного комплексного загрязнения (тяжелые металлы, хлор, пыль) [6, 7].

Как тестовые растения были выбраны широко распространенные в городе робиния лжеакация и вяз мелколистный. Для получения более ясной картины при сравнении данных белковая и небелковая формы азота были представлены в виде процентной доли от общего (рис.3).

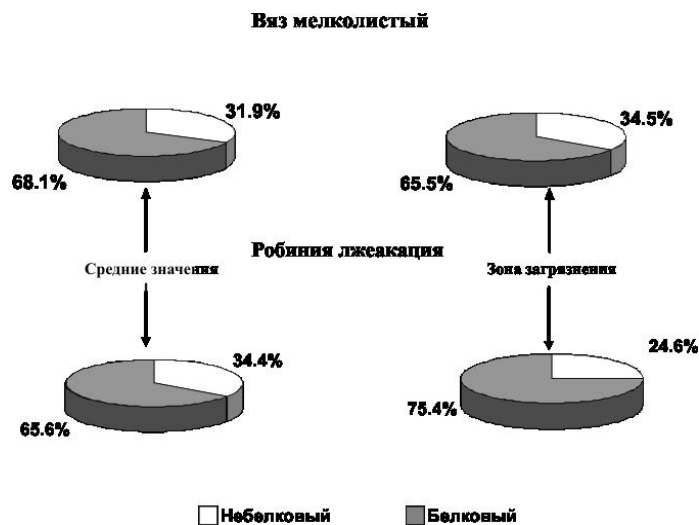


Рис.3. Соотношение белкового и небелкового азота (% от общего)

Было выявлено, что в среднем у робинии лжеакации доля белкового азота составляла 65,6, а небелкового – 34,4 % от общего, в то время как у вяза мелколистного – 68,1 и 31,9 % соответственно. В листьях обоих видов в наиболее загрязненных зонах города содержание общего азота повышалось и достигало максимума, причем больше у робинии лжеакации- в 1,4-2,3 раза. Однако если у робинии это увеличение происходило за счет белковой, то у вяза – небелковой фракции.

В листьях робинии лжеакации в зонах загрязнения доля белкового азота увеличилась до 75,4 % от общего, а небелкового уменьшилась на 9,8 единиц по сравнению со средним значением. У вяза мелколистного процентная часть белкового азота уменьшилась до 65,5 %, а небелкового – увеличилась на 2,6 единиц.

Наши исследования показали, что робиния лжеакация является газопылеустойчивым и металлоустойчивым видом, а вяз мелколистный принадлежит к ряду среднеустойчивых растений [6, 7].

Полученные данные свидетельствуют о том, что азотный обмен растений зависит от их устойчивости к загрязнению. Увеличение общего азота наряду с возрастанием концентрации белков является активной защитно-приспособительной реакцией, направленной на метаболизацию токсикантов и повышение устойчивости в неблагоприятных условиях произрастания.

Таким образом, результаты наших исследований позволили сделать ряд выводов.

Листья деревьев, произрастающих в Ереване поглощают и накапливают азот в зависимости от видовых особенностей, фазы вегетации, степени загрязненности территории произрастания.

За исследуемый период максимальные концентрации азота были зафиксированы в растениях в 2006 году, причем интенсивное поглощение и накопление азота происходит в начале вегетации.

В зонах сильного загрязнения в растениях увеличивается содержание азота.

Накопление и перераспределение элемента зависит от экологической устойчивости растений: в листьях наиболее устойчивых видов увеличение общего азота происходит за счет белковой формы.

Изучение количественных изменений различных форм азота, особенно белкового, могут служить хорошими критериями как для выявления устойчивости вида, так и степени загрязнения исследуемой территории.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Ներսիսյան Գ.Ս.*, Ազոտի կուտակման դիսաբիլիան Երևան քաղաքի բույսերում, Տեղեկատվական տեխնոլոգիաներ և կառավարում, Երևան, №10, էջ. 123-129, 2007:
2. Биоиндикация загрязнения наземных экосистем. / Под. ред. Р.Шуберта.-Москва, Мир, 350 с., 1988.
3. *Боровиков В.* Статистика. Искусство анализа данных на компьютере. СПб.: Питер, 688 с., 2003.
4. *Илькун Г.М.* Газоустойчивость растений, Киев, "Наукова думка", 246 с., 1971.
5. *Маргарян А.А., Оганесян А.А.* Экспресс-микрометод колориметрического определения фракций азота в растениях. Информационный листок, Ереван, АрмНИИНТИ, №28, 4 с., 1979.
6. Оганесян А.А., Нерсисян Г.С. О содержании хлора в листьях растений г. Еревана. Мат.-лы межд. научн. конф. "Проблемы устойчивого функционирования водных и наземных экосистем", Россия, Ростов-на-Дону, с. 397-399, 2006.
7. *Оганесян А.А., Аветисян М.Г., Нерсисян Г.С.* Фитоиндикация свинцового загрязнения в г. Ереване. Вестник МАНЭБ, Санкт-Петербург, Россия, 13, 4, вып. 2, с. 54-56, 2008.
8. *Сергейчик С.А.* Устойчивость древесных растений в техногенной среде, Минск "Наука и техника", 280 с., 1994.
9. *Тарабрин В.П., Кондратюк Е.Г., Башкатов В.Г. и др.* Фитотоксичность органических и неорганических загрязнителей. Киев, 1986.
10. *Manning WJ and Feder WA*, Biomonitoring Air Pollutants with plants. Appl. Sci. Publ. LTD, London, 140 p., 1980.

Поступила 04.09.2009.



Биолог. журн. Армении, 1 (62), 2010

## ОСОБЕННОСТИ АНТИКОАГУЛЯНТНОГО ДЕЙСТВИЯ СИНТЕТИЧЕСКОГО СОЕДИНЕНИЯ КУМАРИНОВОЙ ПРИРОДЫ С ВЫСОКОЙ СТЕПЕНЬЮ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ

С.С. ОВАКИМЯН

*Научно-технологический центр органической и фармацевтической химии НАН РА  
E-mail kkarageuzyan@mail.ru*

Показана высокая степень антикоагулянтного действия сверхнизких концентраций (10-12 М) синтетического препарата кумаринового ряда под условным названием ГШ-17, представляющего собой N-морфолилтио-уреидо-3-карбамоил производное кумарина. Последнее характеризовалось ингибирующим действием указанного физиологически активного соединения на протромбиновое время крови и тромбопластическую активность мозговой и миокардиальной тканей экспериментальных животных, что представляет не только существенный академический интерес, но имеет также важное прикладное значение.

*Протромбиновое время – тромбопения - тромбопластическая  
активность - аллоксановый диабет, плазма крови - мозговая ткань -  
миокардиальная ткань - ГШ-17*

Ցույց է տրված կումարինային շարքին պատկանող, ԳՇ-17 պայմանական անվանմամբ, սինթետիկ միացության գերցածր չափաբաժինների (10-12 Մ) վառ արտահայտված հակամակարդիչ արդյունավետությունը: Վերջինս պայմանվորված է նշված ֆիզիոլոգիապես ակտիվ միացության, որն իրենից ներկայացնում է կումարինի N-մորֆոլիթիոուրեիդո-3-կարբամոիլ ածանցյալ, արյան պրոթրոմ-բինային ժամանակը երկարեցնող, ինչպես նաև, փորձարարական կենդանիների ուղեղային և սրտամկանային հյուսվածքների տրոմբոպլաստինային ակտիվությունը ճնշող հատկությամբ: Ստացված արդյունքները ներկայացնում են ոչ միայն լուրջ ակադեմիական հետաքրքրություն, այլ ունեն նաև կարևոր կիրառական նշանակություն:

*Պրոթրոմբինային ժամանակ ( թրոմբոպենիա - թրոմբոպլաստինային  
ակտիվություն - ալլոքսանային շաքարախտ - արյան պլազմա - ուղեղային  
հյուսվածք - սրտամկանային հյուսվածք - ԳՇ-17*

High level of anti clotting action of super low concentrations (10-12 M) of a synthetic analogue with coumarin nature has been shown. The functional activity of the latter is characterized by inhibitory action on the prothrombin time of blood as well as on the thromboplastic activity of brain and myocardial tissues of experimental animals. The results of these investigations not only introduce serious academic interest, but also have a significant practical importance.

*Prothrombin time – thrombopenia - thromboplastic activity - alloxan-modulated  
diabetes mellitus - blood plasma - brain tissue - myocardial tissue - GSh-17*

Результаты ранее проведенных исследований Г.Х. Бунятына и сотрудников [3,4,13] подтверждают зависимость времени свертывания крови (ВСК) от сдвигов протромбинового времени (ПВ), тромбопластической активности (ТА), содержа-

ния ионов кальция, фибриногена, колебаний фибринолитической активности, а также от структурно-функциональных особенностей ряда других факторов про- и антикоагулянтного действия в составе форменных элементов крови. Согласно неоднократно поступающей информации ВСК выступает в качестве наиболее быстро реагирующего показателя на действие максимально низких концентраций адреналина, колеблющихся в пределах 1 γ. В то же время отмеченные выше классические регуляторы этого процесса не проявляют признаков мобилизованности и ожидаемого активного вовлечения в различные этапы развития процесса гемокоагуляции [14]. Описанный феномен является доказательством существования многочисленных, до сих пор не выявленных ингредиентов системы свертывания крови, наделенных, по всей вероятности, исключительно высокой энергией реактивности по части своевременного адекватного реагирования на действие эндогенных и экзогенных факторов химической и физической природы. Высказанная точка зрения соответствует укоренившемуся мнению о невторостепенной роли различных липидов, главным образом фосфолипидов (ФЛ) нейтральной и кислой природы (НФЛ и КФЛ соответственно), выступающих в качестве активаторов НФЛ и ингибиторов КФЛ этого процесса [5]. В связи с отмеченным сформировалась принципиально новая позиция о про- и антикоагулянтной роли отдельных представителей гликолипидов [20] и ФЛ [16]. Одним из частных проявлений вышеотмеченного являются феномены, развивающиеся с участием указанных соединений при физиологически и патологически протекающей беременности [15]. Основным метаболическим механизмом подключения факторов липидной природы признается их стимулирующее воздействие на активность ферментативных процессов различной направленности [10], в частности на уровне микросомального аппарата клетки [8], трансдукцию внешнего сигнала внутрь клетки [9], катализ процессов клеточного роста и размножения [6], регенерацию утраченных структурно-организационных элементов [7].

Из последующих сообщений [21], стало известно об антикоагулянтном действии ряда липопротеинов высокой плотности, оказывающих ингибирующее влияние на активность факторов свертывающей системы крови. Особо-го внимания при этом заслуживают сдвиги ПВ в виде гипопротромбинемии (ГПЕ), развивающиеся под влиянием ряда известных факторов антикоагулянтного действия. Проявления ГПЕ, фиксируемые при инициации патологических отклонений на уровне клеточных структур, совершаются при активном участии β-2-гликопротеина с высоким индексом иммуносупрессорного эффекта, контролируемого стероидными гормонами [23] и статусом динамического равновесия между системами про- и антиоксидантного действия. В связи с отмеченным, примечательны методические подходы по своевременному применению антиоксидантотерапии как эффективного метода коррекции нарушений процесса гемокоагуляции, получившего широкое распространение в оптимизации состояния интеграции многочисленных факторов, в том числе и различных ФЛ, включающихся в структурную организацию протромбина (П) [22].

Целью настоящей работы являлось проведение специальных исследований по изучению особенностей действия одного из актуальных синтетических препаратов - N-морфолилтиоуреидо-3-карбамоил производного кумарина под кодовым названием ГШ-17 на динамику ПВ крови и ТА мозговой и миокардиальной тканей белых крыс в эксперименте.

**Материал и методика:** Исследования по сдвигам ПВ проводили на оксалатной плазме крови 120 беспородных белых крыс-самцов, массой 180-200 г, предварительно голодавших в течение 12 ч и содержавшихся в обычных условиях вивария.

Забор крови производили проколом шприцем места слияния верхней поллой и подключичной вен (angulus venosus) до инъекции препарата (контроль) и через 10, 30, 60 мин после в/в введения его 1%-ого р-ра в количестве 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 мл. Объемные соотношения между забираемой кровью и предварительно набранным в шприц стабилизатором (оксалат натрия, гепарин) соблюдались в пределах 9:1. Отделенную центрифугированием при 6000 об/мин плазму крови хранили в холодильнике при 4-8°. Расчет ПВ производили в с образования кровяного сгустка известным методом с использованием раствора тромбопластина (Т), изготовляемого из цельного мозгового гомогената контроль-

ных белых крыс. От умерщвленных декапитированием под легким эфирным наркозом животных в максимально ограниченные промежутки времени на холоду производили изолирование исследованных органов, освобождение их от кровеносных сосудов и декапсулирование, а также многократное промывание их охлажденным физиологическим раствором и обезжизнение механическим пропитанием фильтровальной бумагой. ТА определяли с использованием в качестве источника П контрольной плазмы крови интактных белых крыс или людей-доноров.

**Результаты и обсуждение:** Согласно результатам, отраженным в табл.1, ГШ-17 при в/в введениях выступает в качестве эффективного ингибитора активности П, особенно при использовании минимальных доз – 0,1 и 0,2 мл его 1%-ого раствора уже на 10-й мин после инъекции, что выражается в статистически достоверном удлинении ПВ по сравнению с контролем. Противоположные сдвиги ПВ были зарегистрированы спустя 30 и тем более 60 мин после инъекции указанных концентраций препарата, когда их расхождения от величины этого показателя у интактных животных оказались статистически недостоверными, свидетельствуя тем самым о полном восстановлении исходных величин ПВ.

Изучение особенностей сдвигов ТА мозговой и миокардиальной тканей с проведением сравнительной оценки характера и глубины их проявлений в зависимости от объекта исследования, дозы примененного агента и длительности его экспозиции, привело к установлению ряда интересных закономерностей.

На основании данных, приведенных в табл. 2, величина исходной ТА оказывается наиболее высокой в головном мозге и затем в сердечной мышце, составляя соответственно  $19,0 \pm 0,68$  и  $35,0 \pm 0,98$ . Начиная с 10-й мин после в/в введения всех испытанных концентраций 1%-го р-ра ГШ-17, главным образом его минимальных доз, обнаруживалось статистически достоверное падение ТА исследованных тканей, наиболее обостряющееся на 30-й и особенно 60-й мин действия препарата.

Полученный нами фактический материал свидетельствует о ярко выраженном избирательном ингибирующем действии примененных доз препарата ГШ-17, в особенности его наиболее низких концентраций на ТА исследованных тканей, а также о высокой степени его активности в нормально метаболизирующей мозговой ткани, с трудом поддающейся воздействию ингибирующего агента.

Вместе с тем возможным объяснением особенностей биохимических и молекулярно-биологических механизмов развития отмеченных сдвигов, по всей вероятности, может стать филогенетически признанный статус постоянства исключительно высокого стабилизированного уровня в мозговой ткани различных категорий ФЛ-глицеридов [18], наделенных свойствами стимулирования прокоагулянтной активности крови. К числу последних причисляются фосфатидилхолины (ФХ), лизофосфатидилхолины (ЛФХ), сфингомиелины (СФМ), а также фосфатидилэтаноламины (ФЭ) и их лизопроизводные, вписывающиеся в структурную организацию Т в роли мощных стимуляторов их функциональной активности.

Касаясь категории кислых ФЛ – фосфатидилсеринов (ФС), монофосфоинозитидов (МФИ), полифосфоинозитидов (ПФИ), кардиолипинов (КЛ) и фосфатидных кислот (ФК), активно комплексующихся с факторами антикоагулянтного действия как природными (типа гепарина), так и синтетическими [12,22], следует отметить высокий уровень их стабилизирующего действия на процесс гемокоагуляции. Поэтому нарушения балансирования между качественно-количественным составом функционально различных категорий нейтральных ФЛ (ФХ, ЛФХ, СФМ, ФЭ) и кислых представителей этих соединений (ФС, МФИ, ПФИ, КЛ, ФК) чреваты грубыми осложнениями нормального гемокоагуляционного статуса организма, вплоть до внутрисосудистого тромбообразования [19], имеющими место при расстройствах его функциональной активности, осложняющихся развитием различных патологических состояний.

Таким образом, ТА исследованных тканей и ПВ плазмы крови экспериментальных животных демонстрируют высокую степень реактивности, проявля-

ющейся под действием минимальных доз препарата ГШ-17 в полном соответствии с развиваемой в последнее время концепцией проф. Е.Б. Бурлаковой об исключительно высокой функциональной активности низких концентраций факторов химической и физической природы [1,2,6,10,11,17].

Таблица 1  
Динамика изменения протромбинового времени (в сек) плазмы крови белых крыс с моделированным аллюксаном сахарным диабетом через 10, 30 и 60 мин после внутривенного введения им 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 и 0,5 мл 1 %-ого раствора препарата ГШ-17

| Здоровые (ЗД)                  | Диабет    | Разницы от ЗД | %                      | 0,1 мл | Разницы от ЗД          | %      | 0,2 мл                 | Разницы от ЗД | %                      | 0,3 мл | Разницы от ЗД          | %      | 0,4 мл | Разницы от ЗД | % | 0,5 мл | Разницы от ЗД | % |
|--------------------------------|-----------|---------------|------------------------|--------|------------------------|--------|------------------------|---------------|------------------------|--------|------------------------|--------|--------|---------------|---|--------|---------------|---|
| Время после введения препарата |           |               |                        |        |                        |        |                        |               |                        |        |                        |        |        |               |   |        |               |   |
| 10 мин                         |           |               |                        |        |                        |        |                        |               |                        |        |                        |        |        |               |   |        |               |   |
| 15,8±0,51                      | 10,9±0,39 | - 31,1        | 13,0±0,48 <sup>a</sup> | - 17,7 | 13,4±0,60 <sup>a</sup> | - 20,3 | 12,9±0,44 <sup>a</sup> | - 18,4        | 12,5±0,39 <sup>a</sup> | - 20,9 | 12,1±0,40 <sup>a</sup> | - 23,4 |        |               |   |        |               |   |
| 30 мин                         |           |               |                        |        |                        |        |                        |               |                        |        |                        |        |        |               |   |        |               |   |
| 16,0±0,48                      | 10,1±0,38 | - 36,9        | 15,1±0,47 <sup>o</sup> | - 6,0  | 13,4±0,60 <sup>a</sup> | - 13,7 | 13,4±0,41 <sup>a</sup> | - 16,2        | 13,0±0,47 <sup>a</sup> | - 18,7 | 13,2±0,42 <sup>a</sup> | - 17,5 |        |               |   |        |               |   |
| 60 мин                         |           |               |                        |        |                        |        |                        |               |                        |        |                        |        |        |               |   |        |               |   |
| 15,8±0,47                      | 9,5±0,37  | - 39,9        | 15,6±0,46 <sup>a</sup> | - 1,3  | 13,4±0,60 <sup>a</sup> | - 3,8  | 14,9±0,40 <sup>o</sup> | - 5,7         | 14,4±0,43 <sup>a</sup> | - 8,9  | 13,7±0,61 <sup>a</sup> | - 13,3 |        |               |   |        |               |   |

Примечания: n=60; a-p<0.001; b-p<0.01; в-p<0.5

Таблица 2  
Динамика изменения тромбобластической активности (в сек ПВ) мозговой и миокардиальной тканей белых крыс через 10, 30 и 60 мин после внутривенного введения им 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 и 0,5 мл 1 %-ого раствора препарата ГШ-17

| Ткани                          | Здоровые (ЗД) | Диабет                 | Разницы от ЗД | %                      | 0,1 мл | Разницы от ЗД          | %      | 0,2 мл                 | Разницы от ЗД | %                      | 0,3 мл | Разницы от ЗД          | %      | 0,4 мл | Разницы от ЗД | % | 0,5 мл | Разницы от ЗД | % |
|--------------------------------|---------------|------------------------|---------------|------------------------|--------|------------------------|--------|------------------------|---------------|------------------------|--------|------------------------|--------|--------|---------------|---|--------|---------------|---|
| Время после введения препарата |               |                        |               |                        |        |                        |        |                        |               |                        |        |                        |        |        |               |   |        |               |   |
| 10 мин                         |               |                        |               |                        |        |                        |        |                        |               |                        |        |                        |        |        |               |   |        |               |   |
| Мозговая                       | 19,8±0,66     | 11,6±0,60 <sup>a</sup> | - 41,4        | 13,9±0,61 <sup>a</sup> | - 29,8 | 13,4±0,60 <sup>a</sup> | - 32,3 | 13,5±0,60 <sup>a</sup> | - 31,8        | 13,7±0,61 <sup>a</sup> | - 30,8 | 13,8±0,61 <sup>a</sup> | - 30,3 |        |               |   |        |               |   |
| Миокард                        | 35,6±0,97     | 28,8±0,93 <sup>a</sup> | - 19,1        | 32,3±0,87 <sup>o</sup> | - 9,0  | 30,9±0,91 <sup>o</sup> | - 13,2 | 30,4±0,90 <sup>o</sup> | - 14,4        | 30,2±0,89 <sup>a</sup> | - 15,2 | 30,0±0,87 <sup>a</sup> | - 15,7 |        |               |   |        |               |   |
| 30 мин                         |               |                        |               |                        |        |                        |        |                        |               |                        |        |                        |        |        |               |   |        |               |   |
| Мозговая                       | 19,4±0,66     | 11,8±0,60 <sup>a</sup> | - 39,2        | 17,1±0,60 <sup>o</sup> | - 11,9 | 14,1±0,61 <sup>a</sup> | - 27,3 | 13,9±0,59 <sup>a</sup> | - 28,4        | 13,9±0,63 <sup>a</sup> | - 29,4 | 14,1±0,61 <sup>a</sup> | - 27,3 |        |               |   |        |               |   |
| Миокард                        | 35,3±0,91     | 28,1±0,90 <sup>a</sup> | - 20,4        | 32,9±0,81 <sup>o</sup> | - 6,8  | 31,9±0,89 <sup>o</sup> | - 9,6  | 31,5±0,87 <sup>a</sup> | - 10,8        | 31,4±0,87 <sup>a</sup> | - 11,0 | 31,7±0,85 <sup>a</sup> | - 10,2 |        |               |   |        |               |   |
| 60 мин                         |               |                        |               |                        |        |                        |        |                        |               |                        |        |                        |        |        |               |   |        |               |   |
| Мозговая                       | 20,0±0,67     | 11,7±0,59 <sup>a</sup> | - 41,5        | 19,2±0,67 <sup>a</sup> | - 4,0  | 17,3±0,61 <sup>o</sup> | - 13,5 | 14,8±0,57 <sup>a</sup> | - 26,0        | 14,1±0,63 <sup>a</sup> | - 29,5 | 14,9±0,63 <sup>a</sup> | - 25,5 |        |               |   |        |               |   |
| Миокард                        | 35,9±0,91     | 28,9±0,61 <sup>a</sup> | - 19,5        | 35,5±0,93 <sup>a</sup> | - 1,1  | 32,9±0,77 <sup>o</sup> | - 8,4  | 32,3±0,87 <sup>o</sup> | - 10,0        | 31,9±0,87 <sup>o</sup> | - 11,2 | 32,9±0,85 <sup>a</sup> | - 8,4  |        |               |   |        |               |   |

Примечания: n=60; остальные обозначения те же, что и в табл. 1

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ашмарин И.П., Лелекова Т.В. К вопросу о развитии проблемы эффективности сверхмалых доз биологически активных соединений. Рос. хим. журнал, 43, с. 21-28, 1999.
2. Блюменфельд Л.А. Понятие конструкции в биологической физике. Рос. хим. журнал, 43, с. 15-20, 1999.
3. Бунятыан Г.Х., Казарян Б.А., Карагезян К.Г., Гулян Э.А. К вопросу о проникновении  $\square$ -аминомасляной кислоты через гематоэнцефалический барьер. ДАН Арм. ССР, 40, 5, с. 289-295, 1965.
4. Бунятыан Г.Х. О одновременном образовании условной связи на различные звенья обмена веществ. Тез докл. науч. сессии, посвященной вопросам высшей нервной деятельности и компенсаторным приспособлениям. Изд. АН Арм ССР, Ереван, с. 9-12, 1953.
5. Бунятыан Г.Х., Карагезян К.Г. Условнорефлекторные сдвиги некоторых сторон свертывающей системы крови. ДАН СССР, ХСІХ, 5, с. 831-833. 1954.
6. Бурлакова Е.Б. Особенности действия сверхмалых доз биологически активных веществ и физических факторов низкой интенсивности. Рос. хим. журнал, 43, с. 3-11, 1999.
7. Бурлакова Е.Б. Действие фенозана и экзогенного ацетилхолина на ацетилхолинэстеразу и систему липидной пероксидации в мембранах клеток головного мозга. Рос. хим. журнал, ХLІІІ, 5, с. 63-71, 1999.
8. Бурлакова Е.Б., Гвахария В.О., Глуценко Н.Н., Дупин А.И. Исследование роли липидов в регуляции активности микросомальной глюкозо-6-фосфатазы при модификации микросом *in vivo* и *in vitro*. Биохимия, 44, 6, с. 1111-1116, 1979.
9. Бурлакова Е.Б. Роль липидов в передаче информации в клетке. Сб.: Биохимия липидов и их роль в обмене веществ. М. Наука. с. 23-25, 1981.
10. Веселовский В.А., Веселова Т.В., Чернявский Д.С. Трехфазная (парадоксальная) дозовая зависимость реакций растительной клетки на факторы внешней среды. Рос. хим. журнал, 43, с. 49-54, 1999.
11. Едоян Л.В. Качественно-количественные нарушения фосфолипидов субклеточных образований гепатоцитов аллоксандиабетических белых крыс и коррегирующее действие сверхнизких доз факторов химической и физической природы. Автореф. .... канд. биол. наук, Ереван, 26 с. 2004.
12. Карагезян К.Г., Овакимян С.С., Погосбекова С.Д. Фосфолипиды и тримбластины различных отделов головного мозга в норме и при состояниях возбуждения. Бюл. эксп. биол. и мед., N 8, с. 6-8. 1975.
13. Карагезян К.Г. Неодновременные сдвиги в системе свертывания крови при условнорефлекторном возбуждении и торможении. ДАН Арм. ССР. 20, 1, с. 27-32, 1955.
14. Карагезян К.Г. Безусловнорефлекторные и условнорефлекторные сдвиги некоторых сторон системы свертывания крови и углеводного обмена при воздействии различных доз адреналина. ДАН СССР. 118, 1, с. 142-145, 1958.
15. Карагезян К.Г., Овакимян С.С., Тевосянц А.В. Роль фосфолипидов в активировании и торможении процесса свертывания крови. ДАН СССР, 201, 2, с. 486-489. 1971.
16. Карагезян К.Г., Овакимян С.С., Тевосянц А.В. Эффекты этаноламинфосфатидов и серинфосфатидов на отдельные звенья свертывающей системы крови. ДАН СССР, 201, 3, с. 733-736. 1971.
17. Клеменкова З.С., Антипов Б.Г., Черников Ф.Р., Гусинина М.М., Рибакоева Е.Ю. Сравнительная оценка эффективности сверхнизких доз факторов химической и физической природы. Рос. хим. журнал, 43, с. 34-39. 1999.
18. Крепс Е.М. Кн.: Липиды клеточных мембран. Л., Наука, 338 с., 1981.

19. Овакимян С.С. Фосфолипиды фибриногена и изменения их содержания в процессе фибринообразования. Автореф. дисс, Ереван, 31 с., 1970.
20. Buniatian H.Kh. Studies of the role of gamma-aminobutyric acid in carbohydrates metabolism. Yerevan. 50 p., 1961.
21. Griffin J.H., Kojima K., Banka C.L. et al. J. Lipoproteins in anticoagulant activity. J. Clin. Invest. 103, 2, p. 219-227, 1999.
22. Pengo V., Basilio A., Rampazzo P. et al. The role of phospholipids in structural organization of prothrombin. Thromb. res. 81, 2, p. 256-258, 1999.
23. Rashid M., Durie P., Andrew M. et al. Dependence of immune suppressor activity from functional state of steroid hormones. Am. J. Clin. Nutr. 70, 3, p. 378-382, 1999.

Поступила 04.12.2009.



Биол. журн. Армении, 1 (62), 2010

## ПОЧВЕННЫЕ БЕСПОЗВОНОЧНЫЕ КАК ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ ХОЗЯЕВА ГЕЛЬМИНТОВ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ В АРМЕНИИ

Օ.Յ. НАԴԱՏՅԱՆ, Օ.Վ. ՇԵՐԲԱԿՈՎ

*Государственный аграрный университет Армении*

Изучены состав и сезонные колебания численности почвенных беспозвоночных – потенциальных промежуточных хозяев гельминтов сельскохозяйственных животных. В условиях Армении различные почвенные беспозвоночные (орibatидные клещи, коллемболы, муравьи) оказались в значительной степени зараженными личиночными формами гельминтов *Dicrocoelium dendriticum*, *Moniezia sp.* и *Avitellina centripunctata*, что свидетельствует о наличии в нашей стране активных очагов ряда опасных гельминтозов сельскохозяйственных животных.

*Беспозвоночные-почва-коллемболы-клещи-промежуточные хозяева-цистицеркоиды-гельминты*

Ուսումնասիրվել է գյուղատնտեսական կենդանիների մակարյուծ որդերի միջանկյալ տերեր հանդիսացող հողային անողնաշարների տեսակային կազմը և քանակության սեզոնային տատանումները: Հայաստանի պայմաններում: Պարզվել է, որ տարբեր հողային անողնաշարներ (օրիբատիդային տզերը, կոլեմբոլները, մրջյունները) զգալիորեն վարակված են *Dicrocoelium dendriticum*, *Moniezia sp.* և *Avitellina centripunctata* մակարյուծ որդերի թրթուրային ձևերով, որը վկայում է մեր երկրում գյուղատնտեսական կենդանիների մի շարք վտանգավոր ճգվային հիվանդությունների գործող օջախների առկայության մասին:

*Անողնաշարներ ( հող - կոլեմբոլներ - տզեր - միջանկյալ տերեր - ցիստիցերկոիդներ - ճիճուներ*

The fauna and seasonal ranges in the quantity of soil invertebrates, potential intermediate hosts of farm animal helminthes, have been researched. Different soil invertebrates, e.g. *Oribatei*, *Collembola*, and ants appeared to be significantly infected by *Dicrocoelium dendriticum*, *Moniezia sp.*, *Avitellina centripunctata* helminthes larvae in Armenia. This fact witnesses the presence of active foci of some dangerous helminthiases of the farm animals in our country.

*Invertebrates-soil-Collembola-Acari-intermediate hosts-cysticercoids-helminthes*

Беспозвоночные – простейшие, черви, членистоногие, моллюски и другие являются важным компонентом почвенных экосистем. Кроме того, некоторые из них, особенно членистоногие – микроартроподы, имеют важное эпизоотологическое значение, выступая в роли промежуточных хозяев возбудителей ряда гельминтозов домашних и диких животных (дикроцелиоза, мониезиоза, авителлиноза, тизаниезиоза и др.) [2, 3, 4, 6, 7, 8, 9].

В течение последних десятилетий резко обострилась проблема гельминтозов сельскохозяйственных животных, что, прежде всего, связано с ухудшением условий содержания и кормления. В качестве одного из основных факторов следует также отметить неблагоустроенность пастбищ.

Комплексное исследование почвенных беспозвоночных имеет не только экологическое и эпизоотологическое, но и важное прогностическое и профилактическое значение, позволяя оценить риск заражения животных пастбищными биогельминтами и своевременно принять меры по предотвращению и ликвидации заболеваний.

Несмотря на это, подобных исследований в нашей республике не проводилось более 40 лет. Учитывая вышеизложенное, мы поставили перед собой задачу – изучить состав и сезонные колебания численности почвенных беспозвоночных – потенциальных промежуточных хозяев гельминтов сельскохозяйственных животных.

**Материал и методика:** Исследования проводили в 2008-2009 гг. в лаборатории паразитологии кафедры эпизоотологии и паразитологии Государственного аграрного университета Армении. Материалом для исследования послужили пробы почвы, травы и подстилки, которые брали с выгульных площадок, пастбищ и водоемов, где наиболее вероятен контакт сельскохозяйственных животных с беспозвоночными – промежуточными хозяевами гельминтов.

Почвенных клещей и коллембол выделяли из проб путем термозлечения с использованием аппарата Тульгрена, а также методом обогащения Романенко, широко применяемым при санитарно-паразитологических исследованиях [5]. Муравьев отлавливали непосредственно на пастбищах и выгулах. Для обнаружения личиночных форм гельминтов в теле муравьев применяли компрессионный метод, микроартропод микроскопировали непосредственно.

Исследования проводили в различных почвенных и природно-климатических зонах Армении, в сезонной динамике. В общей сложности было исследовано 53 пробы почвы и 29 проб травы выгульных площадок и пастбищ, 11 проб подстилки, а также 174 муравья *Formica sp.* и 60 – *Proformica sp.*.

**Результаты и обсуждение:** Как показали наши исследования, в различных объектах внешней среды преобладают клещи *Trombidiidae fam.* (найжены в 18,28% исследованных проб) и *Oribatei* (20,43%). Гораздо реже во внешней среде встречаются клещи *Acaridae fam.* (8,60%), *Gamasoidea superfam.* (2,15%), а также коллемболы *Pseudachorutes sp.* и *Parakatianna sp.* (8,60%).

Доминирующими группами микроартропод в почве являются клещи *Trombidiidae fam.* (26,42%) и *Oribatei* (20,75%), в траве – клещи *Oribatei* (17,24%) и *Acaridae fam.* (10,34%), в подстилке – клещи *Oribatei* (27,27%) и *Gamasoidea superfam.* (18,18%).

Наиболее часто клещи *Oribatei*, *Acaridae fam.* и *Trombidiidae fam.* встречаются в почве (соответственно 20,75%, 9,43% и 26,42%). Коллемболы также чаще всего обнаруживаются в почве (15,09%). Клещи *Gamasoidea superfam.* регистрируются преимущественно в подстилке (18,18%).

В высокогорной зоне основным представителем фауны почвенных микроартропод являются клещи *Trombidiidae fam.*; эти же клещи, наряду с *Oribatei*, *Acaridae fam.*, а также коллемболами *Pseudachorutes s.* преобладают в почвах равнинной, предгорной, среднегорной и горно-лесной зон.

Орибатидные клещи *Liacarus coracinus*, *Scheloribates laevigatus* и *Zygoribata cognata*, зараженные цистицеркоидами *Moniezia sp.*, регистрировались только в равнинной и предгорной зонах; коллемболы, зараженные цистицеркоидами *Avitellina centripunctata* – только в равнинной зоне.

Клещи Oribatei и Trombidiidae fam. доминируют во всех типах почв республики, они же являются единственными представителями фауны микроартропод в глинистых почвах. В супесчаных почвах, помимо вышеуказанных беспозвоночных, встречаются также коллемболы *Pseudachorutes sp.*, а в песчаных почвах - клещи Acaridae fam. Суглинистые почвы отличаются особым разнообразием фауны микроартропод. Помимо вышеуказанных клещей, здесь встречаются Acaridae fam. и Gamasoidea superfam., а также коллемболы *Pseudachorutes sp.*, *Parakatianna sp.* и некоторые другие. В суглинистых почвах также обнаружено максимальное количество зараженных цистицеркоидами орибатидных клещей и коллембол.

Сезонные колебания численности клещей из семейств Oribatei, Trombidiidae fam. и Acaridae fam. в различных объектах внешней среды выражены слабо. Весной во внешней среде часто встречаются также клещи Gamasoidea superfam. и коллемболы *Pseudachorutes sp.* и *Parakatianna sp.*.

Максимальное количество микроартропод в почве наблюдалось во второй половине весны. Несколько меньшее количество беспозвоночных обнаруживается в почве во второй половине лета и осенью, минимальное количество – зимой.

Результаты наших исследований согласуются с данными Ильясова о преобладании микроартропод и наибольшем риске заражения жвачных мониезиями в весенний период [1].

Зараженные цистицеркоидами *Moniezia sp.* орибатидные клещи наблюдались преимущественно весной и осенью, а зараженные цистицеркоидами *Avitellina centripunctata* коллемболы – только летом.

Согласно результатам наших исследований, экстенсивность заражения орибатидных клещей цистицеркоидами *Moniezia sp.* в Армении составляет 16,67%, а средняя интенсивность –  $2,25 \pm 0,63$  цистицеркоида в клеще. Экстенсивность заражения коллембол цистицеркоидами *A. centripunctata* равна 25%, а интенсивность не превышает 3 цистицеркоидов.

Следует отметить уникальность обнаружения цистицеркоидов авителлин в организме промежуточных хозяев - коллембол, поскольку подобные исследования проводятся крайне редко, а в Армении не проводились вовсе. Цистицеркоиды найдены в коллемболе, выделенной из овечьей подстилки в мелком подворном хозяйстве из Арагатской области, в летний период (рис.1). Данная находка подтверждает эпизоотологическую роль ногохвосток в циркуляции авителлин в условиях нашей республики, а также свидетельствует о риске заражения жвачных авителлинами в Армении.

Как показали наши исследования, экстенсивность заражения муравьев *Formica sp.* метацеркариями *Dicrocoelium dendriticum* составила 2,38%, а интенсивность – 1 метацеркарии (локализация – надглоточный нервный ганглий). Муравьи *Proformica sp.* не содержали метацеркарий дикроцелий.

Следует также отметить, что в ходе исследований в пробах почвы, травы и подстилки довольно часто обнаруживали яйца геогельминтов, представляющих серьезную опасность для сельскохозяйственных животных. Некоторое количество яиц поедается почвенными беспозвоночными. Часть яиц в организме беспозвоночных погибает, тогда как остальные яйца способны сохранять жизнеспособность и инвазионность, представляя тем самым угрозу с точки зрения заражения животных при случайном заглатывании беспозвоночных.

Таким образом, в Армении в различных объектах внешней среды доминирующими группами микроартропод являются клещи Trombidiidae fam. и Oribatei. Различные почвенные беспозвоночные (орибатидные клещи, коллемболы, муравьи) в значительной степени заражены личиночными формами гельминтов *Dicrocoelium dendriticum*, *Moniezia sp.* и *A. centripunctata*, что свидетельствует о наличии в республике активных природных и антропоургических очагов ряда опасных гельминтозов сельскохозяйственных животных. Если не принять адекватных мер профилактики, неизбежно вовлечение сельскохозяйственных животных в функционизирующие очаги гельминтозов с последующим серьезным ущербом для здоровья животных и серьезными экономическими потерями.



Рис.1. Цистицеркоиды *A. centripunctata* в коллемболе.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Ильясов И.Н. Динамика орибатид – промежуточных хозяев аноплоцефалат сельскохозяйственных животных в Таджикистане. В сб.: “Орибатида (Oribatei), их роль в почвообразовательных процессах”. Вильнюс, с. 235-238, 1970.
2. Исмаилов Г.Д., Рзаев Н.М. Эколого-фаунистический анализ распространения аноплоцефалат у домашних жвачных животных и их промежуточных животных в Азербайджане. Материалы IV Всероссийского Съезда Паразитологического общества при Российской академии наук «Паразитология в XXI веке – проблемы, методы, решения», 2, Санкт-Петербург, с. 14-16, 2008.
3. Козлов Д.П. Коллемболы – возможные промежуточные хозяева *Avitellina arctica* (Cestoda, Anoplocephalata). Паразитология. 20, вып. 1, с. 73-74, 1986.
4. Назарова С.А. Панцирные клещи пустынно-пастбищной зоны Узбекистана – промежуточные хозяева двух мониезий. В сб.: “Орибатида (Oribatei), их роль в почвообразовательных процессах”. Вильнюс, с. 229-233, 1970.
5. Шумакович Е.Е. Гельминтологическая оценка пастбищ. М.: “Колос”, с. 105, 1973.
6. Hohorst W. The role of ants in the developmental process of the lancet-shaped fluke (*Dicrocoelium dendriticum*) (Article in German), *Z. Parasitenkd.* bd. 22, p. 105-106, 1962.
7. Kalkan A. *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) Looss, 1899 in Turkey. I. Field studies of intermediate and final hosts in the South Marmara region, 1968. *Br. Vet. J.* 127, N 2, p. 67-75, 1971.
8. Mazyad S.A., El Garhy M.F. Laboratory and field studies on oribatid mites as intermediate host of *Moniezia expansa* infecting Egyptian sheep. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 34, N 1, p. 305-314. 2004.
9. Xiao L., Herd R.P. Infectivity of *Moniezia benedeni* and *Moniezia expansa* to oribatid mites from Ohio and Georgia. *Vet. Parasitol.* 45, N 1-2, p. 101-110, 1992.

Поступила 24.06.2009.



Биол. журн. Армении, 1 (62), 2010

## ИССЛЕДОВАНИЕ СОЧЕТАННОГО ДЕЙСТВИЯ ХОЛИНОВОГО ЭФИРА N-(П-МЕТОКСИБЕНЗОИЛ)-DL- ФЕНИЛАЛАНИНА И ХОЛИНОВОГО ЭФИРА N-БЕНЗОИЛ- DL-ВАЛИНА НА ВНЕКЛЕТОЧНУЮ ФОНОВУЮ ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ОДИНОЧНЫХ ИНТЕРНЕЙРОНОВ И МОТОНЕЙРОНОВ СПИННОГО МОЗГА КРЫС ПРИ ЛАТЕРАЛЬНОЙ ГЕМИСЕКЦИИ

И. Р. КАРАПЕТЯН, В.О. ТОПУЗЯН, Т.С. ХАЧАТРЯН,  
Э. Ю. АРУТЮНЯН, Г.К. КИПРИАН

*Институт тонкой органической химии им. А. Л. Мнджояна НАН РА,  
Ереванский базовый медицинский колледж № 1*

Обсуждается вопрос применения двух синтезированных производных холина: холинового эфира N-(п-метоксибензоил)-DL-фенилаланина и холинового эфира N-бензоил-DL-валина у крыс с левосторонней латеральной гемисекцией спинного мозга. Полученные результаты свидетельствуют о стойком протекторном эффекте данных соединений на изменение внеклеточной фоновой электрической активности одиночных нейронов спинного мозга крыс. Регистрация и анализ вызванной активности одиночных мотонейронов спинного мозга проводились посредством специальных математических программ в режиме on-line.

*Спинной мозг – гемисекция – нейроны – фоновая активность – холин – эфиры*

Ուսումնասիրվել է խոլինի երկու սինթեզված ածանցյալների՝ խոլինի եթերի N-(n/մեթօքսիբենզոիլ)/DL/ֆենիլալանինի և խոլինի եթերի N/բենզոիլ/DL/վալինի համակցված ազդեցությունը առնետների ողնուղեղի նեյրոնների էլակետային էլեկտրական ակտիվության վրա վերջինիս լատերալ կիսահատման դեպքում: Ստացված տվյալները վկայում են տվյալ միացությունները ստացող առնետների մոտ ողնուղեղի առանձին նեյրոնների էլակետային ակտիվության արտահայտված դրական արդյունքի մասին: Ողնուղեղի նեյրոնների արտաբջջային էլակետային ակտիվության գրանցումը և վերլուծությունը կատարվել են մաթեմատիկական հատուկ ծրագրերով՝ on/line ռեժիմում:

*Ողնուղեղ (կիսահատում / նեյրոններ ( էլակետային ակտիվություն ( խոլին ( եթերներ*

In these series of investigations the issue of the influence of two synthetic choline derivates like choline N-(p-metoxybenzoil)-DL-phenilalnyn ester and choline N-benzoil-DL-valin ester on extracellular background electrical activity of spinal cord single neurons in rats with the left – side lateral hemisection of spinal cord has been discussed. The obtained results showed the strong, protective effect of these chemical substances in rats. The registration and analysis of the extracellular background electrical activity of spinal cord single neurons has been done by means of special mathematical software in on-line mode.

*Spinal cord – hemisection – neurons – background activity – choline – esters*

Проблема восстановительных процессов при повреждениях спинного мозга у млекопитающих при воздействии различных веществ как натурального, так и синтетического происхождения, несомненно, является одним из актуальнейших вопросов современной биологии и медицины [1,2,3]. Компенсаторные приспособления в повреждённом организме осуществляются благодаря сложному синтезу многообразных взаимодействующих в организме и в особенности в нервной системе процессов, к которым относится, в частности, регенерация повреждённых структур, что неоднократно отмечает Асратян [4,5,6]. Между тем до недавнего времени считалось, что в процессе эволюции млекопитающие животные безвозвратно утратили ценную способность регенерации нервных волокон в месте повреждения спинного мозга (СМ). Изучение восстановительной способности спинного мозга млекопитающих проводилось многими исследователями на протяжении более 100 лет, и полученные результаты приводятся в ранних обзорных статьях и монографиях ряда авторов [15,16,18,24]. Достижения медицинской науки во второй половине 20-го века способствовали снижению смертности при травматической болезни СМ [13,24]. Однако стойкость соматических и вегетативных нейрогенных нарушений является причиной инвалидизации подавляющего большинства больных с поражениями СМ, во время которых нарушается проведение нервных импульсов. В ряде исследований [10,13,15,16] рассматриваются вопросы о состоянии восстановительных процессов при повреждении СМ у млекопитающих и при воздействиях в данных случаях разных препаратов. В наших работах, помимо обсуждения большого литературного материала по этой проблеме, центральное место занимают данные экспериментов, проведенных с помощью электрофизиологических, нейроморфологических, гистохимических методик и математической статистики по сравнительному изучению эффективности как отдельных препаратов натурального и синтетического происхождения, так и их разных сочетаний и способов воздействия при повреждениях СМ.

Известно, что холин (от греч. *choly* – жёлчь), гидроокись 2-оксиэтилтриметиламмония,  $[(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}] \text{OH}^-$ . Это бесцветные кристаллы, хорошо растворимые в воде, этиловом спирте, нерастворимые в эфире, бензоле. Холин легко образует соли с сильными кислотами, его водные растворы обладают свойствами сильных щелочей. Впервые получен из жёлчи. Широко распространён в живых организмах. Особенно высоко содержание его в яичном желтке, мозге, печени, почках и мышце сердца. Холин обычно относят к витаминам группы В, хотя животные и микроорганизмы способны его синтезировать. Он входит в состав фосфолипидов (например, лецитина, сфингомиелина), служит источником метильных групп в синтезе метионина. Из холина в организме животных синтезируется ацетилхолин – один из важнейших химических передатчиков нервных импульсов. Холин является так называемым липотропным веществом, предотвращает тяжёлые заболевания печени, возникающие при её жировом перерождении. В медицине для лечения заболеваний печени применяют хлорид холина [14]. Его вводят также в состав комбикормов сельскохозяйственных животных. Для аналитических целей используют способность холина давать плохо растворимые соли с фосфорновольфрамовой, платинохлористоводородной и некоторыми другими гетерополикиклотами [14,17,20–23].

Холин является аминспиртом, химическим веществом, близким по своему строению к фосфатидовым кислотам, наиболее простой форме фосфолипидов, которые, как известно, служат главными компонентами биологических мембран [9]. Отличительным признаком фосфатидовых кислот является наличие остатка фосфорной кислоты, который образует сложноэфирную связь с гидроксильной группой *sn*-С-3 глицерина. Поэтому фосфолипиды, по крайней мере в нейтральной области pH, несут отрицательный заряд. Наиболее простая форма фосфолипидов, фосфатидовые кислоты, являются фосфо- моноэфирами диацилглицерина. Фосфа-

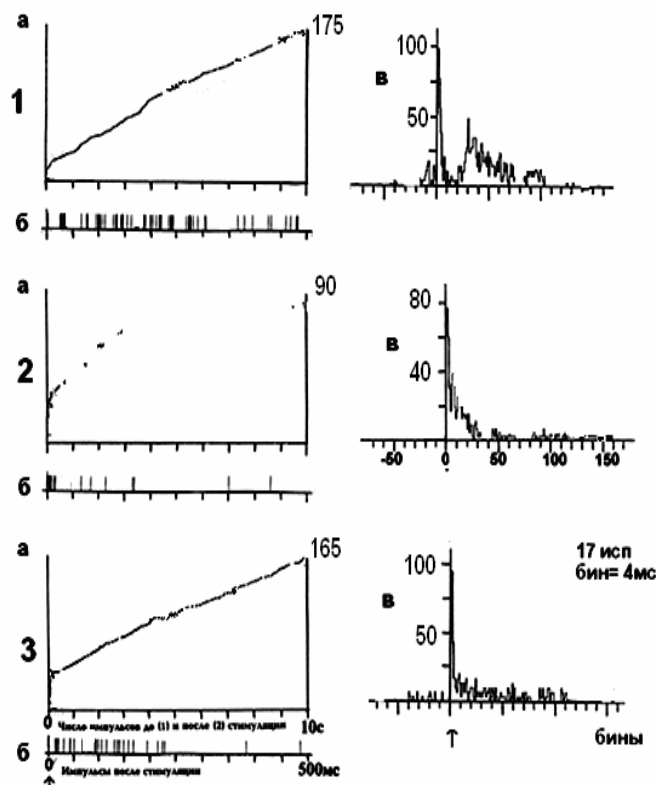
тидовые кислоты – важнейшие предшественники в биосинтезе жиров и фосфолипидов. Фосфатидовые кислоты могут быть получены из фосфоглицеридов с помощью фосфолипаз. Фосфатидовая кислота (остаток фосфатидил –) служит исходным веществом для синтеза других фосфолипидов. Остаток фосфорной кислоты может образовывать сложноэфирную связь с гидроксильными группами аминокиспиртов (холин, этаноламин или серин) или полиспиртов (миоинозит). Холин является предшественником ацетилхолина – одного из передатчиков нервных импульсов, или нейромедиаторов [17, 20, 22]. Для синтеза нейромедиатора ацетилхолина нервная ткань получает холин извне, поскольку он в мозге практически не синтезируется и поступает туда из крови через гематоэнцефалический барьер. Часть холина используется для ресинтеза лецитина и убихинона, другая часть в холинергических нейронах – для синтеза ацетилхолина. Внутриклеточное содержание холина в ткани мозга составляет больше 50 %, остальная часть захватывается терминалями из синаптической щели после гидролиза и используется повторно. Захваченный холинергическими терминалями холин (60–72 %) сразу превращается в ацетилхолин. Биосинтез холина осуществляется путём метилирования N-диметиламиноэтанола, синтезируемого из серина [23,28].

В корригировании нейрогенных нарушений невторостепенна роль эфиров холина, в частности ацетилхолина, заслуживающих существенного внимания с точки зрения особенностей его синтеза и биологической активности, являющегося составной частью системы нейроэндокринной регуляции организма [14,17,19,25–28]. Согласно результатам исследований последних лет [19,20,23,25–28], холиновыми эфирами осуществляется ряд важнейших функций в организме человека и животных. Вместе с тем продолжают отсутствовать сведения относительно применения эфиров холина при спинномозговых повреждениях различной степени выраженности и результатов их действия на интернейроны (ИН) и мотонейроны (МН) СМ.

Исходя из поиска оптимальных средств, стимулирующих и благоприятствующих росту волокон повреждённых путей СМ и с учётом вышеотмеченных особенностей холиновых эфиров, нами предпринята попытка исследовать сочетанное действие двух эфиров холина: холинового эфира N-(п-метоксибензоил)-DL-фенилаланина (ХЭФ) и холинового эфира N-бензоил-DL-валина (ХЭВ), синтезированных в институте тонкой органической химии им. А.Л. Мнджояна НАН РА под руководством д.х.н. Топузяна В.О., на внеклеточную фоновую электрическую активность одиночных ИН и МН СМ крыс в норме и при его экспериментальных повреждениях типа гемисекции (ГМС).

**Материал и методика:** Эксперименты поставлены на 50 белых крысах – самцах, массой (210–230 г), разделённых на следующие подопытные группы: первая – 10 экз. – интактные животные; вторая – 20 экз. – животные с левосторонней латеральной ГМС СМ на уровне Т8–Т9; третья – 20 экз. – животные с левосторонней латеральной ГМС СМ на уровне Т8–Т9, получавшие в течение 1 месяца ежедневно сочетанные инъекции ХЭФ и ХЭВ в место повреждения СМ (дозировка – 100 мкг/кг массы животного – ХЭФ и 100 мкг/кг массы животного – ХЭВ, каждое животное индивидуально). После проведения клинических наблюдений и дачи препаратов на всех 3 группах животных были поставлены электрофизиологические эксперименты. Микроэлектро-физиологическими методами производили экстраклеточную регистрацию внеклеточной фоновой электрической активности (ФА) одиночных ИН дорсального рога СМ и одиночных МН вентрального рога СМ крыс. Отведение активности исследуемых мотонейронов проводили стеклянным микроэлектродом с диаметром кончика 1–2 мк, заполненным 2М раствором NaCl. Регистрацию ФА ИН и МН проводили с помощью специально разработанной математической программы, обеспечивающей в режиме on-line селекцию спайков посредством амплитудной дискриминации спайков и последующим построением куммулятивной импульсной гистограммы для выбора необходимого режима записи вызванной активности одиночных ИН и МН СМ. Анализ полученных данных осуществляли по алгоритму, подробно описанному в наших предыдущих статьях [11]. Более подробно с программной методикой наших экспериментов можно ознакомиться в нашей работе [12].

**Результаты и обсуждение.** На рис. 1 демонстрируется пример куммулятивной (рис. 1, а) и суммированной (рис. 1, в) гистограмм ФА одиночного фоновоактивного МН СМ (глубина 1200 мкм) в норме (рис. 1, а, б, в); у крыс с левосторонней латеральной ГМС СМ (глубина 1200 мкм, рис. 1, 2, а, б, в) и у крыс с левосторонней латеральной ГМС СМ, получавших сочетанные инъекции ХЭФ и ХЭВ в течение 1 месяца (глубина 1200 мкм, рис. 1, 3, а, б, в). Как видно из рисунка, последствия спинномозгового повреждения проявляются в виде урежения ФА одиночного МН СМ по сравнению с нормой.

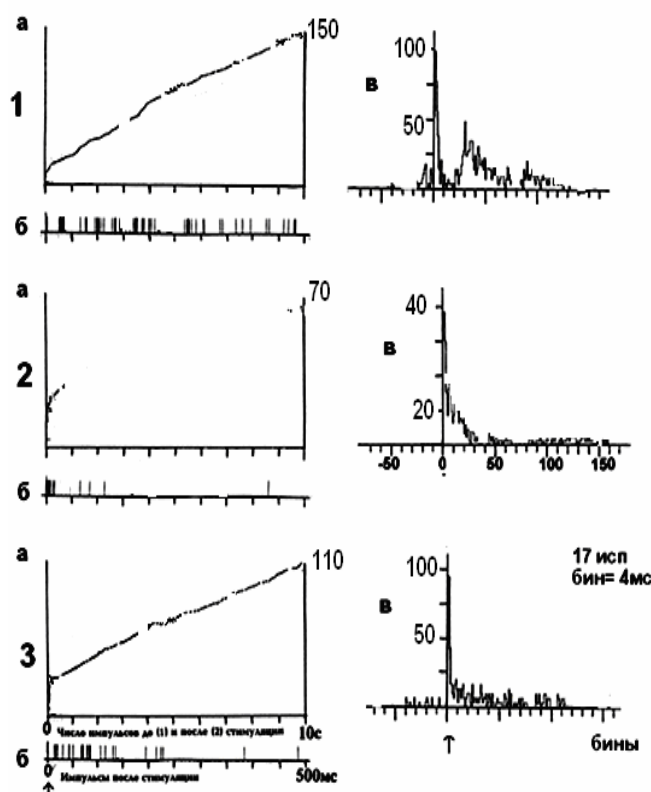


**Рис. 1.** Внеклеточная фоновая электрическая активность одиночного мотонейрона спинного мозга крыс в норме (1 а, б, в); одиночного мотонейрона спинного мозга крыс при левосторонней латеральной гемисекции (2 а, б, в) и одиночного мотонейрона спинного мозга у крыс с левосторонней латеральной гемисекцией, получавших в течение 1 месяца ежедневно сочетанные инъекции ХЭФ и ХЭВ (3а, б, в). Глубина отведения 3 мотонейронов – 1300 мк.

Данный эффект хорошо виден на куммулятивной гистограмме (рис. 1, 2, а, 1), где имеет место уменьшение числа импульсов в пачке; и на суммированной (17 исп.) гистограмме (рис. 1, 2, в), на которой наблюдается аналогичный эффект.

На рис. 2 демонстрируется пример куммулятивной (рис. 2, а) и суммированной (рис. 2, в) гистограмм ФА одиночного фоновоактивного ИН СМ (глубина 800 мкм) в норме (рис. 2, 1, а, б, в); у крыс с левосторонней латеральной ГМС СМ (глубина 800 мкм, рис. 1, 2, а, б, в) и у крыс с левосторонней латеральной ГМС СМ, получавших сочетанные инъекции ХЭФ и ХЭВ в течение 1 месяца (глубина 800 мкм, рис. 2, 3, а, б, в).

Как видно из рис. 2, и в случае с ИН последствия спинномозгового повреждения проявляются также в виде урежения ФА одиночного ИН СМ по сравнению с нормой. Данный эффект хорошо виден на куммулятивной гистограмме (рис. 2, 2, а, 1), где имеет место уменьшение числа импульсов в пачке, и на суммированной (17 исп.) гистограмме (рис. 2, 2, в), на которой также наблюдается аналогичный эффект.



**Рис. 2.** Внеклеточная фоновая электрическая активность одиночного интернейрона спинного мозга крыс в норме (1 а, б, в); одиночного интернейрона спинного мозга крыс при левосторонней латеральной гемисекции (2 а, б, в) и одиночного интернейрона спинного мозга у крыс с левосторонней латеральной гемисекцией, получавших в течение 1 месяца ежедневно сочетанные инъекции ХЭФ и ХЭВ (3 а, б, в). Глубина отведения 3 мотонейронов – 800 мк.

При сравнении зарегистрированной картины ФА у одиночных ИН и МН СМ крыс можно прийти к заключению, что в целом при спинномозговом повреждении (ГМС) проявляется резкое урежение ФА одиночных ИН и МН и переход её из нормального регулярного типа разряда данных нейронов в патологический “пачечный” тип разряда (рис. 1, 2, а, б, в).

При систематическом каждодневном введении ХЭФ и ХЭВ в вышеуказанных дозировках проявляется резкое учащение ФА как ИН, так и МН, сопровождающееся исчезновением пачечной активности и восстановлением практически до нормы регулярного типа разряда данных спинномозговых нейронов (рис. 1, 3, а, б, в; рис. 2, 3, а, б, в), вызванное, вероятно, протекторными свойствами данных холиновых эфиров (ХЭФ и ХЭВ).

Ранее нами исследовались действия холиновых производных [7] в сочетании с тиреоидным гормоном тироксином при повреждениях спинного мозга, а также действие ХЭФ на фоновую и вызванную активность одиночных пирамидных нейронов IV слоя коры больших полушарий головного мозга крыс при латеральной ГМС СМ [8]. Анализируя данные проведенных исследований, пришли к выводу о том, что в целом имеется положительный эффект от сочетанного применения холиновых производных (ХЭФ и ХЭВ) при органических повреждениях спинного мозга у крыс и наблюдается наличие стойких положительных результатов.

Таким образом, результаты наших исследований свидетельствуют о протекторном действии сочетанного комплекса ХЭФ и ХЭВ на ФА одиночных ИН и МН СМ при его органических повреждениях типа левосторонней латеральной ГМС.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Андреасян А.С., Хачатрян Т.С.* Влияние лидазы на проводимость повреждённого спинного мозга. Вестник МАНЭБ, 8, 7, 206–210, 2003.
2. *Андреасян А.С., Матинян Л.А., Хачатрян Т.С.* Роль тироксина в изменении фоновой электрической активности пирамидных нейронов коры больших полушарий головного мозга крыс при органическом повреждении спинного мозга. Вестник МАНЭБ, 3, 142–145, 2004.
3. *Андреасян А.С., Хачатрян Т.С.* Исследования комплексного влияния лидазы, тироксина и структурированной воды на электрическую активность одиночных пирамидных нейронов коры больших полушарий головного мозга крыс до и после гемисекции спинного мозга. Вестник МАНЭБ, 12, 4, 207–209, 2007.
4. *Асратян Э.А.* Физиология центральной нервной системы (научные работы). Изд. АН СССР, М., с. 338–362; 380, 342, 354–359, 425, 1953.
5. *Асратян Э.А.* Лекции по некоторым вопросам нейрофизиологии. Изд. АН СССР, М., с. 5–34, 1959.
6. *Асратян Э.А.* К теории компенсации функций. В кн.: Проблема компенсаторных приспособлений. Изд. АН СССР, М., с. 235–245, 1960.
7. *Киприян Т.К., Топузян В.О., Карапетян И.Р., Хачатрян Т.С.* Анализ влияния сочетанного комплекса тироксина и йодметилата 2–(диметиламно) этилового эфира-N-(п-метоксибензоил)-DL-фенилаланина на электрическую активность повреждённых травмой одиночных мотонейронов спинного мозга крыс. В сб.: Международная научная конференция “Актуальные проблемы интегративной деятельности и пластичности нервной системы”, посвящ. 80-летию со дня рождения академика НАН РА, чл.-корр. РАН В.В. Фанарджяна, Ереван, Изд. “Гитутюн” НАН РА, с. 154–158, 2009.
8. *Киприян Т.К., Топузян В.О., Карапетян И.Р., Арутюнян Э.Ю., Хачатрян Т.С.* Влияние йодметилата 2–(диметиламно) этилового эфира – N–(п-метоксибензоил)-DL-фенилаланина на фоновую и вызванную активность одиночных пирамидных нейронов IV слоя коры больших полушарий головного мозга крыс при латеральной гемисекции спинного мозга. Ж. Мед. Наука Армении, XLIX, 2, с. 31–34, 2009.
9. *Ткачук В.А.* Молекулярные механизмы нейроэндокринной регуляции. Соровский научно-образовательный журнал, 6, с. 5–10, 1998.
10. *Угрюмов В.М.* Восстановление функций при закрытых повреждениях позвоночника и спинного мозга. В кн.: Восстановление функций при поражениях центральной нервной и периферической нервной системы. Материалы симпозиума. Л., 104, 105, 1967.

11. *Хачатрян Т.С., Матинян Л.А., Андреасян А.С., Киприян Т.К.* Роль тироксина в изменении электрической активности интернейронов и мотонейронов повреждённого спинного мозга крыс. Вопросы теоретической и клинической медицины, 5, 1 (25), 40–45, 2002.
12. *Хачатрян Т.С.* Действие лидазы и тироксина на фоновую электрическую активность одиночных пирамидных нейронов коры больших полушарий крыс. Биолог. журн. Армении, 59, 3–4, 2007, 198–202.
13. *Benes V.* Poraneni michy. Praha, 184, 1965.
14. *Brown J.O., McCouch G.P.* Abortive regeneration of the transected spinal cord. 1947. J. Comp. Neurol., v. 87, № 2, pp. 131 – 137.
15. *Clemente C.D.* Structural regeneration in the mammalian central nervous system and the role of neuroglia and connective tissue. 1955. In: «Regeneration in the central nervous system» (W.F. Windle, ed.), Springfield, Illinois, pp. 147–161.
16. *Clemente C.D., Windle W.F.* Regeneration of severed nerve fibers in the spinal cord of the adult cat. 1954. J. Comp. Neurol., 101, № 3, pp. 691 – 731.
17. *Eibl K. H., Lewis G.P., Betts K., Linberg K.A., Gandorfer A., Kampik A., Fisher S.K.* The effect of alkylphosphocholines on intraretinal proliferation initiated by experimental retinal detachment. J. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 48, 3, p. 1305–1311. 2007.
18. *Fawcett J.V.* bindibg spinal cord injuries. J. Rehabil. Med., 9, 40, pp. 780–782, 2008.
19. *Carrasco M.P., Jimenes – Lopez J.M., Segovia J.L., Marco C.* Hexadecylphosphocholine interferes with the intracellular transport of cholesterol in HepG2 cells. J. FEBS, 8, 275, , pp. 1675–1686. 2008.
20. *Holmes–McNary M.Q., Cheng W.L., Mar M.H., Fussel S., Zeisel S.H.* Choline and choline esters in human and rat milk and in infant formulas. J. Am. J. Clin. Nutr., 4, 64, pp. 572–576, 1996.
21. *Lillesaar C., Stigloher C., Tannhauser B., Wullimann M.F., Bally – Cuif L.* Axonal projections originating from raphe serotonergic neurons in the developing and adult zebrafish, *Danio rerio*, using transgenics to visualize raphe-specific *pet1* expression. J. Comp. Neurol., 2, 512, pp. 158–182, 2009.
22. *Maestro B., Gonzalez A., Garcia P., Sanz J. M.* Inhibition of pneumococcal choline-binding proteins and cell growth by esters of bicyclic amines. J. FEBS, 2, 274, pp. 364–376, 2007.
23. *Masson P., Froment M.T., Gillon E., Nachon F., Lockridge O., Schopfer L.M.* Hydrolysis of oxo- and thio-esters by human butyrylcholinesterase. J. Biochim. Biophys. Acta, 1, 1774, pp. 1–34, 2007.
24. *Perez–Orribo L., Perez–Lorensu P.J., Roldan–Delgado H., Garcia–Conde M., Spreafico M., Garcia–Marin V.* Intraoperative neurophysiological monitoring of the spinal cord: our experience. J. Rev. Neurol., 5, 47, pp. 236–241, 2008.
25. *Placzek A.N., Dani J.A.* Synaptic plasticity within midbrain dopamine centers contributes to nicotine addiction. J. Nebr. Symp. Motiv., 55, pp. 5–15, 2009.
26. *Zeisel S.H.* Choline: Needed for Normal Development of Memory. J. Am. J. Clin. Nutr., 19, 9005, pp. 528–531, 2000.
27. *Zeisel S.H.* Nutritional Importance of Choline for Brain Development. J. Am. J. Clin. Nutr., 90006, pp. 621–626, 2004.
28. *Zelder F. H., Salvio R., Rebek J. Jr.* A synthetic receptor for phosphocholine esters. J. Chem. Commun. (Camb.), 12, 28, pp. 1280–1282, 2006.

*Поступила 09.11.2009.*



## ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ БЕЛЫХ КРЫС ПОД ВЛИЯНИЕМ ШУМА И $\alpha_2$ -АДРЕНОБЛОКАТОРОВ

Л.С. УНАНЯН<sup>1</sup>, О.П. СОЦКИЙ<sup>1</sup>, Л.Г. ХАЧАТРЯН<sup>1</sup>,  
Э.А. ШИРИНЯН<sup>2</sup>, М.М. МЕЛКОНЯН<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ЕМГУ им. М. Гераци, <sup>2</sup>Институт тонкой органической химии НАН РА

Исследована степень окисления суммарных белков сыворотки крови белых крыс в норме, под влиянием шума и  $\alpha_2$ -адреноблокаторов. С помощью метода, основанного на реакции взаимодействия 2,4-ди-нитро-фенилгидразина (ДНФГ) с окисленными аминокислотными остатками белков, установлено, что исследуемые факторы по убыванию степени окисляемости суммарных белков сыворотки крови по данному маркеру располагаются в следующей последовательности: шум, идазоксан, бедитин. Пред-варительное внутрибрюшинное введение бедитина, 2 мг/кг массы, в отличие от идазоксана, препятствует повышению содержания нейтральных динитрофенилгидразонов в сыворотке крови крыс, подвергнутых воздействию шума в течение 2 ч.

*Стресс □ окислительная модификация белков □  $\alpha_2$ -адреноблокаторы □  
динитрофенилгидразоны*

Նորմայում, աղմկային պթեսի և  $\alpha_2$ -ադրենոբլոկատորների (իդազոքսան, բեդիտին) ներարկման պայմաններում, սպիտակ առնետների շիճուկում ուսում-նասիրվել է գումարային սպիտակուցների օքսիդացման աստիճանը, որի մասին է վկայում օքսիդացված ամինաթթուներ պարունակող սպիտակուցների և 2,4-դի-նիտրոֆենիլհիդրազինի (ԴՆՖՀ) փոխադեցության արդյունքում առաջացած դինիտրոֆենիլհիդրազոնների քանակը: Հաստատվել է, որ ըստ արյան շիճուկում գումարային սպիտակուցների օքսիդացման աստիճանի նվազման, տրված գործոնները դասավորվում են հետևյալ հաջորդականությամբ՝ աղմուկ, իդա-զոքսան, բեդիտին: Բեդիտինի 2մգ/կգ չափաբաժնի նախնական ներորովայնային ներարկումը, ի տարբերություն իդազոքսանի, կանխում է երկու ժամ աղմկային պթեսի ենթարկած առնետների շիճուկում չեզոք դինիտրոֆենիլհիդրազոնների պարունակության աճը:

*Մթես ( սպիտակուցների օքսիդատիվ մոդիֆիկացում (  $\alpha_2$ -ադրենոբլոկատորներ, դինիտրոֆենիլհիդրազոններ*

The 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNFH) test was used for estimating the blood serum proteins' oxidation level in white mongrel rats' serum in norm, under the influence of (91 dBA, 2hr) noise and  $\alpha_2$ -adrenoblockers (beditin and idazoxan intraperitoneal injection). It was shown that oxidation intensity of proteins, particularly the level of dinitrophenylhydrazones, which are formed with the carbonyl groups of aminoresidues of proteins, decreased in the following sequence: noise, idazoxan, beditin. Preliminary intraperitoneal injection of beditin (2mg/kg), prevents the increase of the neutral dinitrophenylhydrazones content in serum of the rats, exposed to the noise.

*Stress □ oxidative modification of proteins □  $\alpha_2$ -adrenoblockers □ dinitrophenylhydrazones*

Как известно, любое острое воздействие на живой организм сопровождается активацией систем защиты. Одной из таких систем адаптации клетки является многокомпонентная система, включающая образование активных форм кислорода (АФК) и регуляцию их содержания в клетке [6]. На ранних этапах изучения роли АФК в клетке исследователи считали, что свободные радикалы, образующиеся за счёт неполного восстановления  $O_2$ , играют отрицательную роль, вызывая окислительную деструкцию липидов, и, что самое главное, белков, нарушая их функции [8,9,10,12,15,16,17]. В настоящее время установлено, что активные формы кислорода в физиологических концентрациях осуществляют передачу сигналов внешней и внутренней сред организма через регуляторные метаболические каскады [1]. Эти данные и послужили основой для расширенных исследований о роли АФК в функционировании белков и липидов в норме и патологии. Исследования, проводимые с начала 80-х годов в ЕрГМУ, продемонстрировали развитие выраженных изменений в процессах перекисного окисления липидов (ПОЛ), нарушение дисбаланса в системе ПОЛ-антиоксидантная система в условиях воздействия шума высокого уровня (91-97 дБА), наиболее часто встречаемого на производствах, транспорте и быту, зависимость их от продолжительности воздействия и пола экспериментальных животных. Предварительное одноразовое (профилактическое, при одноразовом воздействии шума) и систематическое применение антиоксидантов природного ( $\alpha$ -токоферол) происхождения и целого ряда синтетических препаратов, обладающих антиоксидантными свойствами, в условиях хронического эксперимента показало их различную эффективность в регуляции изученных параметров. Полученные в эксперименте результаты нашли свое подтверждение при изучении крови работников ткацкого цеха камвольного комбината (уровень шума 95 дБА) [4]. Вместе с тем, литературные данные о высоком уровне атеросклеротического поражения сосудов у рабочих предприятий с высоким уровнем шума, результаты собственных исследований интенсивности ПОЛ в крови, показателей атерогенности, нарушения деятельности сердечно-сосудистой системы работников ткацкого цеха, послужили основанием для поиска соединений, обладающих как сосудистым, так и, возможно, антиоксидантными свойствами. Учитывая вышесказанное, мы поставили перед собой задачу изучить влияние шума (острый акустический стресс) и нового  $\alpha_2$ -адреноблокатора – бедитина, впервые синтезированного в ИТОХ НАН Армении, на окислительную модификацию белков (ОМБ) сыворотки крови. Выбор бедитина в качестве объекта исследования объясняется тем, что он обладает как сосудорасширяющим, так и антигипоксическим, антиагрегационным и антидотным эффектами, в механизмах развития которых важная роль отводится процессам свободнорадикального окисления, что подтверждается также его влиянием на метаболизм арахидоновой кислоты [5,13].

**Материал и методика:** Эксперименты проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 150-180 г, содержащихся на стандартном пищевом рационе. Подопытные животные подразделяли на 6 групп. Крысы 1-й группы (интактные) служили контролем. Крысы 2, 4, 6 групп подвергали воздействию шума уровнем 91 дБА с максимальной энергией в области средних и высоких частот в течение 2 ч. Животным 3,4,5,6 групп предварительно внутрибрюшинно вводили  $\alpha_2$ -адреноблокаторы бедитин или идазоксан в дозе 2 мг/кг массы. Идазоксан (“Reckitt Colman” Англия) использовали в качестве известного блокатора  $\alpha_2$ -адренорецепторов. Через 2 ч подопытных животных декапитировали и брали сыворотку крови на исследование.

Для оценки интенсивности спонтанной окислительной модификации белков сыворотки крови был использован метод, модифицированный Дубининой и соавт. [2], основанный на реакции взаимодействия карбонильных производных белков и шиффовых оснований с 2,4-динитрофенилгидразином (ДНФГ) с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов. Для проведения анализов брали сыворотку крови крыс, принятой в лабораторной диагностике [3], в количестве 0,05 мл на пробу. Осаждение белков сыворотки осуществляли 20%-ным раствором ТХУ. К денатурированным белкам приливали равный объём (1 мл) 0,1 М раствора 2,4-ДНФГ, приготовленного на 2 М растворе HCl. Контрольная проба вместо 2,4-ДНФГ содержала равный

объем 2 М раствора HCl. Инкубацию проб проводили в течение 1 ч при комнатной температуре. Для осаждения белков пробы центрифугировали при 3000 x g в течение 15-20 мин. Образовавшийся осадок промывали 3 раза смесью этанол-этилацетат (1:1) для экстракции липидов и непрореагировавшего с карбонильными группами окисленных белков 2,4-ДНФГ. Полученный осадок от оставшейся смеси этанолацетата подсушивали током N<sub>2</sub>. Высушенный осадок растворяли в 2,5 мл 8 М раствора мочевины на кипящей водяной бане в течение 5 мин до полного растворения. Образовавшиеся 2,4-динитрофенилгидразоны регистрировали на спектрофотометре СФ-26 при следующих длинах волн: 356, 370 и 430 нм. Количество образовавшихся 2,4-динитрофенилгидразонов рассчитывали, используя коэффициент молярной экстинкции, равный  $21 \cdot 10^3 \text{ моль}^{-1} \text{ см}^{-1}$  [12].

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программы "Statistic for Windows ver. 7.0". Для количественных нормально распределённых признаков оценку статистической достоверности проводили при помощи критерия Стьюдента (*t*).

**Результаты и обсуждение.** В табл.1 представлены данные о степени ОМБ сыворотки крови крыс интактной группы и групп, подвергшихся воздействию шума,  $\square_2$ -блокаторов и их комбинированного воздействия.

Изучение карбонильных продуктов окисления белков сыворотки крови интактных животных с помощью ДНФГ выявило наличие алифатических кетон-динитрофенилгидразонов нейтрального (регистрация при 356, 370 нм) и основного (регистрация при 430 нм) характера. Выявлено, что содержание алифатических кетон-динитрофенилгидразонов нейтрального характера в 13-16 раз превышает содержание динитрофенилгидразонов основного характера (табл.1). Аналогичные данные были получены Дубининой и соавт. при исследовании ОМБ крови здоровых людей [2]. Анализ данных (табл.1) по оценке степени окисляемости белков сыворотки крови животных под воздействием шума,  $\square_2$ -адреноблокаторов и их комбинированного действия (2, 3, 4, 5, 6 группы) показал, что все эти факторы повышают содержание нейтральных и основных кетон-динитрофенилгидразонов в разной степени, но не влияют на их качественный состав. Наиболее высокий уровень карбонильных продуктов белков, оцениваемых с помощью ДНФГ, наблюдается в сыворотках крови животных 2-й и 6-й групп.  $\square_2$ -Адреноблокаторы также повышают уровни продуктов окисления белков сыворотки по сравнению с интактной группой, однако эффект бедитина выражен в меньшей степени, чем идазоксана. Так, если под действием бедитина содержание нейтральных кетондинитрофенилгидразонов, регистрируемых при длине волны 356 нм, увеличивается в 1,38 раза по сравнению с аналогичными динитрофенилгидразонами интактной группы, то под влиянием идазоксана - в 1.75 раза. Такая же картина наблюдается и при сравнении степеней повышения уровней карбонильных продуктов окисления белков сыворотки, регистрируемых при длине волны 370 нм под влиянием изучаемых  $\square_2$ -адреноблокаторов. Этот факт свидетельствует о том, что идазоксан, по сравнению с бедитином, в большей степени активизирует окислительные процессы, и следовательно с этой точки зрения является более токсичным (табл.1). Не исключено, что одной из причин менее выраженной окислительной деструкции белков сыворотки крови при введении бедитина, по сравнению с идазоксаном, является его способность подавлять образование супероксидного аниона  $\text{O}_2^-$  [13]. Об этом также свидетельствуют полученные нами данные об интенсивности процессов перекисного окисления липидов в изученных образцах [11]. Это мнение подтверждается результатами исследований сравнительной токсичности  $\square_2$ -адреноблокаторов [7].

Важно отметить, что менее выраженная активация окислительных процессов при введении бедитина по сравнению с идазоксаном выявляется и на фоне шума (табл. 1). Так, у животных, находящихся под воздействием шума при предварительном введении бедитина, не отмечается достоверных отклонений в содержании нейтральных кетон-динитрофенилгидразонов от контрольного уровня.

Одновременно регистрируется уменьшение почти в 2 раза основных кетон-динитрофенилгидразонов по сравнению с группой, подвергающейся воздействию шума. Не исключено, что влияние бедитина на содержание нейтральных алифатических кетон-динитрофенилгидразонов и снижение содержания основных кетон-динитрофенилгидразонов в сыворотке крови животных 4-й группы, возможно, является результатом влияния бедитина на функционирование антиоксидантной системы, в частности путем поддержания определённого равновесия между антиоксидантными и прооксидантными системами [2,7].

Другим важным фактом, выявленным в результате проведённых исследований, является выраженное увеличение основных кетон-динитрофенилгидразонов, регистрируемых при длине волны 430 нм. Так, например, если уровень нейтральных алифатических кетон-динитрофенилгидразонов, регистрируемых при длине волны 370 нм, при воздействии шума возрастает примерно в 2 раза по сравнению с интактной группой, то основных – в 19,9 раза. Возможно, столь существенные сдвиги в уровне основных кетон-динитрофенилгидразонов в условиях воздействия изученных факторов связаны с усиленным гликозилированием белков, что характерно для стрессовых состояний. Показано, что гликозилирование белков тесно связано со свободно-радикальными процессами, при этом содержание продуктов неферментативного гликозилирования белков в условиях окислительного стресса возрастает [14, 18].

**Таблица 1.** Содержание 2,4-динитрофенилгидразонов в сыворотке крови белых крыс под влиянием шума и □-адреноблокаторов (в единицах оптической плотности в пересчете на 1 г белка, n = 6).

| Группа животных | Условия опытов  | 356 нм                                        | 370 нм                                         | 430 нм                                         |
|-----------------|-----------------|-----------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|
|                 |                 | На 1 г белка                                  |                                                |                                                |
| 1.              | Контроль        | 30,1 ± 0,9                                    | 35,0 ± 0,9                                     | 2,2 ± 0,3                                      |
| 2.              | Шум             | 57,8 ± 5<br>p<0,001                           | 64,4 ± 5<br>p<0,001                            | 40,3 ± 3,4<br>p<0,001                          |
| 3.              | Бедитин         | 41,6 ± 2,5<br>p<0,001                         | 45,8 ± 2,9<br>p<0,001                          | 20,2 ± 1,6<br>p<0,001                          |
| 4.              | Бедитин + Шум   | 36,3 ± 1,9<br>p<0,001<br>p <sub>1</sub> <0,01 | 39,8 ± 2,1<br>p<0,001<br>p <sub>1</sub> <0,001 | 21,2 ± 1,5<br>p<0,001<br>p <sub>1</sub> <0,001 |
| 5.              | Идазоксан       | 52,7 ± 2,3<br>p<0,001                         | 57,5 ± 2,7<br>p<0,001                          | 26,2 ± 1,2<br>p<0,001                          |
| 6.              | Идазоксан + Шум | 59 ± 6,8<br>p<0,001<br>p <sub>1</sub> >0,05   | 66,9 ± 6,2<br>p<0,001<br>p <sub>1</sub> >0,02  | 40,4 ± 4,2<br>p<0,001<br>p <sub>1</sub> >0,05  |

**Примечание:** p – по сравнению с контролем  
p<sub>1</sub> – по сравнению с шумом

Аналогичная картина просматривается и при анализе действия бедитина и идазоксана на исследуемые продукты окисления белков сыворотки.

Таким образом, проведенные исследования о влиянии шума, □<sub>2</sub>-адреноблокаторов и их комбинированного воздействия на интенсивность окисления белков сыворотки крови белых крыс показали, что наиболее выраженное воздействие оказывает шум, а из □<sub>2</sub>-адреноблокаторов – идазоксан. Предварительное внутрибрюшинное введение бедитина в дозе 2 мг/кг массы, в отличие от идазоксана, препятствует повышению содержания нейтральных динитрофенилгидразонов в сыворотке крови крыс, подвергнутых воздействию шума в течение 2 ч, что свидетельствует о его регуляторном воздействии в условиях акустического стресса.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клиничко-биохимические аспекты. Санкт-Петербург: Изд-во "Медицинская пресса", 276-282, 2006.
2. Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Поротов Г.Е. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения. Вопросы мед. химии. 41, 1, 24–26, 1995.
3. Камышиников В.С. Справочник по клиничко-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. Москва, 117, 2004.
4. Мелконян М.М. Перекисное окисление липидов и применение антиоксидантов при акустическом стрессе. Докт. диссертация, 49-52, 1988.
5. Паносян А.Г., Григорян Г.Х., Ширинян Э.А., Мартиросян О.М., Маркарян Э.А., Акопов С.Е., Габриелян Э.С. Синтез и исследование простагландинов. Матер. IV конференции по простагландинам. Минск, 116, 1989.
6. Сазонтова Т.Г., Архипенко Ю.В. Значение баланса прооксидантов и антиоксидантов–равнозначных участников метаболизма. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 3, 2-18, 2007.
7. Ширинян Э.А. Потенциальное лекарственное средство "Бедитин" – новая разработка ИТОХ. О связи между химическим строением и биологической активностью синтезированных в ИТОХ новых соединений. Ереван, 47-56, 1997.
8. Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R., & Milzani, A.. Protein carbonylation in human diseases. Trends Mol. Med., 9, 169–176, 2003.
9. Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., & Milzani, A.. Biomarkers of oxidative damage in human disease. Clin. Chem., 52, 601–623, 2006.
10. Dalle-Donne, I., Scaloni, A., Giustarini, D., Cavarra, E., Tell, G., Lungarella, G., et al.. Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: The contribution of redox proteomics. Mass Spectrom. Rev., 24, 55–99, 2005.
11. Hunanyan L., Manukyan A., Minasyan A.\*, Hakobyan N., Javroyan J., Melkonyan M.\* The effects of selective alpha-adrenoblocker beditin in white rat tissues in acoustic stress conditions. Neurochemical Research, Abstracts Honoring the 100<sup>th</sup> Anniversary of H.Kh.Buniatian. 33, 6/June, pages 1163-1167, 2008.
12. Oliver CN, Ahn BW, Moerman EJ, Goldstein S, Stadtman ER. Age-related changes in oxidized proteins. J Biol Chem. Apr 25; 262, 12, 5488-91, 1987.
13. Panossian A., Grigorian G., Akopov S., Markarian E., Vartanian S., Gabtielian E.. Biochemical Pharmacology, 53, 11, 1753-1755, 1997.
14. Sathiyapriya V., Selvaraj N., Nandeesha H. et al. Munch G., Keis R., Wessels A. et al. Enhanced glycation of hemoglobin and plasma proteins is associated with increased lipid peroxide levels in non-diabetic hypertensive subjects. Arch Med Res. Nov; 38, 8, 822-6, 2007.
15. Stadtman, E.R.. Role of oxidant species in aging. Curr. Med. Chem., 11, 1105–1112, 2004.
16. Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M.). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem. Biol. Interact., 160, 1–40, 2006.
17. Valko, M., Dieter, L., Jan, M., Mark, T.D., Milan, M., Joshua, T.. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Inter. J. Biochem. & Cell Biol., 39, 45-56, 2007.
18. Yim M.B., Kang S.-O., Chock P.B. Enzyme-like activity of glycated cross-linked proteins in free radical generation. Ann.N.Y.Acad.Sci. 899, 168-181, 2000.

Поступила 01.12.2009.



Биолог. журн. Армении, 1 (62), 2010

## ДВУХСТАДИЙНАЯ КИНЕТИКА АДСОРБЦИИ ПРОТЯЖЕННЫХ ЛИГАНДОВ НА ДНК

В.Б. АРАКЕЛЯН<sup>1</sup>, М.А. ЭЛИЗБАРЯН<sup>2</sup>, П.О. ВАРДЕВАНИАН<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ереванский госуниверситет, биол.факультет, каф. биофизики,  
E.mail: biophys\_dep@mail.ru

<sup>2</sup>Российско-армянский (славянский) университет, каф. математической кибернетики

В работе построена математическая модель двухстадийной кинетики адсорбции протяженных лигандов на дуплексах ДНК. Одна из стадий - это диффузия лигандов к адсорбционным центрам, другая - непосредственное связывание лиганда с местом адсорбции. Получена система нелинейных дифференциальных уравнений, описывающих процесс связывания. На основе численного решения системы нелинейных уравнений получена изотерма адсорбции. Показано, что в зависимости от соотношения между константами скоростей адсорбции и десорбции лигандов на ДНК и скоростью диффузии лиганда в растворе могут реализовываться как экспоненциальная, так и S - образная кинетика адсорбции.

*Адсорбция лигандов - ДНК – кинетика адсорбции лигандов-  
нелинейные уравнения*

Աշխատանքում բերված է ԴՆԹ-ի կրկնակի պարույրի հետ երկայնաձիգ լիգանդների կապման երկփուլ կինետիկայի մաթեմատիկական մոդելը: Առաջին փուլն իրենից ներկայացնում է կապման կենտրոնի վրա լիգանդների դիֆուզիան, իսկ երկրորդը՝ կապման տեղին լիգանդի անմիջական կապումը: Ստացված է ոչ գծային դիֆերենցիալ հավասարումների համակարգ, որը նկարագրում է կապման պրոցեսը: Ոչ գծային հավասարումների համակարգի թվային լուծման արդյունքում ստացվել է կապման կորը: Ցույց է տրվել, որ կախված ԴՆԹ-ի հետ լիգանդների կապման և պոկման արագությունների հաստատունների և լուծույթում լիգանդների դիֆուզիայի արագության միջև հարաբերությունից, կապման կինետիկան կարող է լինել ինչպես էքսպոնենցիալ, այնպես էլ S-աձև:

*ԴՆԹ (լիգանդների ադսորբցիա (լիգանդների ադսորբցիայի կինետիկա (ոչ գծային հավասարումներ*

In present work the mathematical model of two-phases kinetics of adsorptions of extended ligands on DNA duplexes has been constructed. One of the stages is diffusion of ligands to adsorption centers, and other stage is direct binding of ligands to adsorption site. The system of nonlinear differential equations describing the binding process was obtained. Based on the numerical resolution of system of the nonlinear equations the adsorption isotherm was obtained. It was shown that in dependence on ratio between rate constants of adsorption and desorption of ligands on DNA and rate of ligands diffusion in a solution both exponential as well as S - shape kinetics of adsorption may occur.

*DNA – adsorption of ligands – kinetics of ligands adsorption  
– non linear equations*

В основе всех молекулярных ДНК-биосенсоров лежит регистрирование события высокоспецифического распознавания последовательностей нуклеиновых кислот [2,6,8]. Молекула ДНК является самой подходящей для использования в биосенсорах, так как взаимодействие между двумя комплементарными цепями ДНК является специфичным и достаточно прочным. В типичной конфигурации одноцепочная ДНК-мишень иммобилизована на подложке и образует слой распознавания. Если в растворе есть одноцепочные ДНК, комплементарные ДНК-мишеням, то образуются дуплексы ДНК. Образование дуплекса активизирует сигнал, который, преобразовываясь в электрические импульсы, передается регистрирующему устройству [9]. Отметим, что дуплексы ДНК, как правило, окружены большим количеством лигандов разного типа, адсорбция которых на ДНК дуплексах может сильно влиять на процесс формирования выходного сигнала биосенсора. Так как процессу непосредственного связывания лиганда с адсорбционным центром на ДНК (кинетическая стадия) предшествует диффузия лиганда из глубинных слоев раствора к адсорбционному центру (диффузионная стадия), то в первую очередь следует выяснить, как влияет диффузия в растворе на кинетику адсорбции лиганда [3,4,5,7]. В данной работе исследована кинетика связывания протяженных лигандов с ДНК дуплексами в условиях, когда следует учитывать диффузионную стадию.

**Теоретическая часть.** Рассмотрим адсорбцию в среде с единичным объемом. В этом случае число частиц в системе будет равно его концентрации. При переходе от конечных объемов к произвольным следует переопределить концентрации. По аналогии с [4] запишем систему уравнений, которая описывает кинетику адсорбции лигандов на ДНК с учетом как диффузионной стадии, так и кинетической. Диффузию лигандов в растворе опишем стандартным способом с помощью нестационарного уравнения диффузии

$$\frac{\partial c_L(x,t)}{\partial t} = D_L \frac{\partial^2 c_L(x,t)}{\partial x^2}, \quad (1)$$

где  $C_L(x,t)$  число молекул лигандов в растворе;  $D_L$  - коэффициент диффузии лигандов. Кинетическую стадию адсорбции протяженных лигандов на ДНК представим как квазихимическую реакцию связывания лиганда (L) из раствора со свободным адсорбционным местом (M) на ДНК [3]



где (LM) – комплекс лиганда с ДНК;  $k_1$  и  $k_{-1}$  - константы скорости образования и распада комплекса (LM) соответственно. Исходя из (2), можно написать следующее балансное уравнение, описывающее изменение числа адсорбированных на ДНК лигандов  $C_{LA}(x,t)$  в виде

$$\frac{\partial C_{LA}}{\partial t} = t^+(C_{LA}) - t^-(C_{LA}), \quad (3)$$

где  $t^+(C_{LA})$  и  $t^-(C_{LA})$  - число лигандов, адсорбирующихся и десорбирующихся на ДНК в единицу времени соответственно. Выражение для  $t^-(C_{LA})$  определяется легко. Поскольку на ДНК адсорбировано  $C_{LA}$  лигандов, то число десорбирующихся лигандов в единицу времени равно  $k_{-1}C_{LA}$ , т.е.

$$t^-(C_{LA}) = k_{-1}C_{LA}, \quad (4)$$

Для определения  $t^+(C_{LA})$  запишем его в виде

$$t^+(C_{LA}) = k_1 C_L M_{LA}, \quad (5)$$

где  $M_{LA}$  - число свободных мест на ДНК, способных связать лиганд. При определении  $M_{LA}$  представим ДНК в виде одномерного кристалла с  $N$  мест связывания, а лиганд, имеющий намного меньшие линейные размеры, при адсорбции занимает  $n$  подряд расположенных мест на ДНК. В этом случае, следуя работе [1], для  $M_{LA}$  можно получить следующее выражение

$$M_{LA} = \left( \frac{N - nc_{LA}}{N - (n-1)c_{LA}} \right)^n (N - (n-1)c_{LA}). \quad (6)$$

Подставив (6) в (5) для  $t^+(C_{LA})$ , получим

$$t^+(c_{LA}) = k_1 c_L \left( \frac{N - nc_{LA}}{N - (n-1)c_{LA}} \right)^n (N - (n-1)c_{LA}). \quad (7)$$

Подставив (4) и (7) в (3), получим следующее окончательное уравнение, описывающее изменение числа адсорбированных на ДНК лигандов  $c_{LA}(x, t)$  в виде

$$\frac{\partial c_{LA}}{\partial t} = k_1 c_L \left( \frac{N - nc_{LA}}{N - (n-1)c_{LA}} \right)^n (N - (n-1)c_{LA}) - k_{-1} c_{LA}. \quad (8)$$

Поскольку в начальный момент времени все адсорбционные места на ДНК свободны, т.е. нет адсорбированных лигандов на ДНК, то начальное условие к уравнению (8) следующее

$$c_{LA}(x, 0) = 0. \quad (9)$$

Исходя из кинетической схемы, легко заметить, что

$$\frac{\partial c_{LA}}{\partial t} = -\frac{\partial c_L}{\partial t}. \quad (10)$$

Так как изменение концентрации лигандов как в объеме, так и во времени происходит в результате диффузии и квазихимической реакции связывания лиганда с адсорбционным местом на ДНК, то уравнение, описывающее изменение числа молекул лигандов в растворе, будет иметь вид

$$\begin{aligned} \frac{\partial c_L(x, t)}{\partial t} = D_L \frac{\partial^2 c_L(x, t)}{\partial x^2} - \\ - k_1 c_L \left( \frac{N - nc_{LA}}{N - (n-1)c_{LA}} \right)^n (N - (n-1)c_{LA}) + k_{-1} c_{LA}. \end{aligned} \quad (11)$$

Для того, чтобы решить уравнение (11) следует задать начальное и граничные условия. Поскольку в начальный момент времени в области, где находятся молекулы ДНК, не было лигандов, то начальное условие к уравнению (11) следующее

$$c_L(x, 0) = 0. \quad (12)$$

На границе с объемным раствором концентрация лиганда постоянна и равна  $C_{L_0}$ , а подложка непроницаема для лигандов. Учитывая это, имеем следующие граничные условия

$$\begin{aligned} \left( \frac{\partial c_L(x, t)}{\partial x} \right)_{x=0} = 0 \\ c_L(l, t) = c_{L_0}. \end{aligned} \quad (13)$$

Таким образом, система уравнений, описывающая двухстадийную кинетику адсорбции протяженных лигандов на ДНК, будет иметь следующий окончательный вид:

$$\begin{aligned} \frac{\partial c_L(x, t)}{\partial t} = D_L \frac{\partial^2 c_L(x, t)}{\partial x^2} - \\ - k_1 c_L \left( \frac{N - nc_{LA}}{N - (n-1)c_{LA}} \right)^n (N - (n-1)c_{LA}) + k_{-1} c_{LA} \end{aligned} \quad (11a)$$

$$\frac{dc_{LA}}{dt} = k_1 c_L \left( \frac{N - nc_{LA}}{N - (n-1)c_{LA}} \right)^n (N - (n-1)c_{LA}) - k_{-1} c_{LA}. \quad (8a)$$

Граничные и начальные условия системы уравнений (11а) и (8а) являются (9), (12) и (13). После решения системы уравнений (11а) и (8а) можно определить изотерму адсорбции по формуле

$$c_{LA}(t) = \int_0^l c_{LA}(x, t) dx. \quad (14)$$

Система уравнений (11а) и (8а) нелинейна и не имеет аналитического решения. Для анализа кинетики двухстадийной адсорбции протяженных лигандов на ДНК систему уравнений (11а) и (8а) следует решить численно. Для этого перепишем систему (11а) и (8а), граничные и начальные условия (9), (12) и (13) в безразмерном виде.

$$\frac{\partial c_1(x, t)}{\partial \tau} = \frac{\partial^2 c_1(x, t)}{\partial \xi^2} - \alpha c_1 \left( \frac{1 - nc_2}{1 - (n-1)c_2} \right)^n (1 - (n-1)c_2) + \beta_1 \beta c_2 \quad (11б)$$

$$\frac{\partial c_2}{\partial \tau} = \frac{\alpha}{\beta_1} c_1 \left( \frac{1 - nc_2}{1 - (n-1)c_2} \right)^n (1 - (n-1)c_2) - \beta c_2 \quad (8б)$$

$$c_1 = c_L / c_{L_0}, \quad c_2 = c_{LA} / N, \quad \xi = x / l, \quad \tau = t \cdot D_L / l^2$$

$$\alpha = \frac{l^2 k_1 N}{D_L}, \quad \beta = \frac{l^2 k_{-1}}{D_L}, \quad \beta_1 = \frac{N}{c_{L_0}}.$$

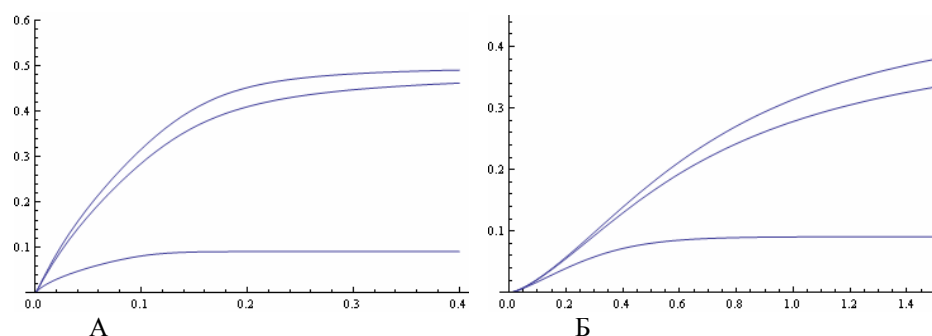
Численно решив уравнения (11б) и (8б), можно определить кинетику заполнения адсорбционных центров на ДНК дуплексе по формуле

$$\theta(\tau) = \int_0^1 c_2(\xi, \tau) d\xi. \quad (15)$$

**Результаты и обсуждение.** Поскольку в подавляющем большинстве случаев  $N < c_{L_0}$ , то из анализа системы (11б) и (8б) следует, что параметр  $\beta_1$  меньше единицы. Параметры  $\alpha$  и  $\beta$  положительны и могут быть как больше, так и меньше единицы. Для анализа влияния стадийности на кинетику адсорбции лигандов на ДНК примем, что заданы концентрации лигандов в объеме раствора и число адсорбционных центров. Зафиксируем параметр  $\beta_1$  и будем варьировать параметры  $\alpha$  и  $\beta$ . Результаты численного интегрирования уравнений (11б) - (8б) и (15) представлены на рис.1 А и Б. Из рис.1А видно, что с увеличением константы скорости десорбции (нижняя кривая) степень заполнения уменьшается.

Двухстадийная кинетика при определенном соотношении между параметрами может привести к S - образной кинетике заполнения дуплексов лигандами. Это обстоятельство показано на рис.1 Б. В случае быстрой диффузии может реализоваться экспоненциальная кинетика связывания лигандов с ДНК.

Построенная в данной работе математическая модель двухстадийной кинетики адсорбции протяженных лигандов на дуплексах ДНК относится к случаю, когда объемный раствор непосредственно примыкает к иммобилизованным молекулам ДНК. В зависимости от соотношения констант скоростей адсорбции и десорбции протяженных лигандов на ДНК и скоростью диффузии лиганда в растворе могут реализоваться различные варианты адсорбции.



**Рис. 1.** Двухстадийная кинетика адсорбции лигандов на ДНК.

По оси X безразмерное время,  $\tau$ , по оси Y степень заполнения ДНК  $\theta$ .

На всех кривых  $\beta_1 = 0.1$ ,  $n=2$ . На А-  $\alpha = 10$ , на Б-  $\alpha = 0.1$ .

Значения  $\beta$  на кривых  $\beta = 0.01$ ,  $\beta = 1$ ,  $\beta = 10$  (сверху вниз).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Нечипуренко Ю.Д., Гурский Г.В. Термодинамические модели связывания лигандов с ДНК. *Биофизика*, 48, с. 773-796, 2003.
2. Нечипуренко Ю.Д., Заседателев А.С., Гурский Г.В. Кооперативные взаимодействия при связывании протяженных лигандов с ДНК. 1 Неконтактные кооперативные взаимодействия. *Мол. биол.*, 18, с. 798-812, 1984.
3. Arakelyan V.B., Babayan Yu.S., Potikyan G. Determination of constant rates of adsorption of ligand on DNA: Analysis of correlation function. *J. Biomol. Str. Dyn.* 18, 2, 231-235, 2000.
4. Crothers D. Calculation of binding isotherms for heterogeneous polymers. *Biopolymers*, 6, 575-584, 1968.
5. McGhee J.D. and von Hippel P.H. Theoretical Aspects of DNA-Protein Inter-actions: Co-operative and Non-co-operative Binding of Large Ligands to a One-dimensional Homogeneous Lattice. *J. Mol. Biol.*, 86, 469-489, 1974.
6. Arakelyan V.B., Babayan S.Yu., Tairyan V.I., Arakelyan A.V., Parsadanyan M.A., Vardevanyan P.O. Kinetics of Ligand Binding to Nucleic Acids, *JBSD*, 24, 2, 479-484, 2006.
7. Arakelyan V.B., Elizbaryan M.A., Asatryan D.G. Mathematical modeling of kinetics of ligands adsorption on DNA, International Conference DAAD Alumni Seminar «Biotechnology and Health-3», Yerevan, Armenia, 10-13, 2009.
8. Bishop J., Blair S., Chagovetz A.M. A Competitive Kinetic Model of Nucleic Acid Surface Hybridization in the Presence of Point Mutants. *Biophysical J.* 90, 381-840. 2006.
9. Chan V., Graves D.J., Fortina P., McKenzie. Absorption and surface diffusion of DNA oligonucleotides at liquid/solid interfaces, *Langmuir*, 13, 320-329, 1997.
10. Drummond T.G., Hill M.G., Barton J. Electrochemical DNA sensors, *Nat. biotechnology*, 21, 10, 1192-1199, 2003.
11. Erickson D., Li D., Krull U.J. Modeling of DNA Hybridization Kinetic for Spatially Resolved biochips. *Analytical Biochemistry* 317, 186-200, 2003.
12. Hagan M.F., Chakraborty A.K. Hybridization dynamics of surface immobilized DNA. *J.Chem. Phys.* 120, p.4958-4968, 2004.
13. Palecek E., Fojta M., Jelen F. New approaches in the development of DNA sensors. Hybridization and electrochemical detection of DNA and RNA at two different surfaces. *Bioelectrochemistry*, 56, p.85-90, 2002.

Поступила 20.11.2009.



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 1(62), 2010

## ՍՅՈՒՆԻՔԻ ՄԱՐԶՈՒՄ ՄԱՐԴՈՒ ԿԵՆՑԱՂԱՅԻՆ ԳՈՐԾՈՒՆԵՈՒԹՅԱՆ ՀԵՏԵՎԱՆՔՈՎ ՇՐՋԱԿԱ ՄԻՋԱՎԱՅՐ ՆԵՐՄՈՒԾՎՈՂ ԿԵՆՍԱԾԻՆ ՏԱՐՐԵՐԻ ՔԱՆԱԿԱԿԱՆ ԲՆՈՒԹԱԳԻՐԸ

Գ.Ա. ԳԵՎՈՐԳՅԱՆ, Ա.Ա. ԴԱՆԻԵԼՅԱՆ, Կ.Վ. ԳՐԻԳՈՐՅԱՆ

*Երևանի պետական համալսարան, Էկոլոգիայի և բնության պահպանության ամբիոն*

Քննարկվում են Սյունիքի մարզում մարդու կենցաղային գործունեության առանձնահատկությունները, տրված են դրանց հետևանքով շրջակա միջավայր ներմուծված կենսածին տարրերի, մասնավորապես, ազոտի և ֆոսֆորի քանակական բնութագրերը:

*Շրջակա միջավայր - կենսածին տարրեր*

Обсуждаются особенности человеческой деятельности в пределах Сю-никского региона. Рассматривается величина влияния антропогенного фак-тора, особенно количества азота и фосфора, на окружающую среду.

*Окружающая среда - биогенные элементы*

The peculiarities of human activities in Syunik Marz, as well as the value of anthropogenic factor impact on the environment, particularly quantities of nitrogen and phosphorus were discussed.

*Environment – biogenic elements*

Սյունիքի մարզը զբաղեցնում է Հայաստանի Հանրապետության տարածքի ծայր հարավարևելյան հատվածը: Այն կազմավորվել է 1996թ. հունվարի 1-ին՝ ներառելով Կապանի, Գորիսի, Սիսիանի և Մեղրու նախկին վարչական շրջանների տարածքները: Մարզկենտրոնը հանդիսանում է Կապան քաղաքը: Մարզի տարածքը կազմում է 4506 կմ<sup>2</sup> [2], բնակչության թիվը՝ 152,9 հազ. մարդ, որից քաղաքային շրջաններում՝ 103,7 հազ. մարդ, իսկ գյուղական շրջաններում՝ 49,2 հազ. [1]: Այն 3 կողմից սեպաձև խրված է արևելքից՝ Ադրբեջանի, արևմուտքից՝ նրա մաս կազմող Նախիջևանի հանրապետության, իսկ հարավից՝ Իրանի միջև: ՀՀ մարզերից սահմանակից է միայն Վայոց ձորին, որի հետ սահմանն անցնում է հյուսիս-արևմուտքում: Սահմանի ընդհանուր երկարությունը կազմում է 472 կմ: Այդ պատճառով էլ Սյունիքը գրեթե անբողջությամբ դիտվում է որպես սահմանամերձ գոտի [2]:

Մարզը ընկած է հյուսիսային լայնության 39°34'-ից մինչև 38°84' և արևելյան երկայնության 46°56'-ից մինչև 45°99'-ն [4]:

Սյունիքում ձմեռը սկսվում է, երբ օդի միջին ջերմաստիճանը հաստատուն կերպով իջնում է 0°-ից և ավարտվում է 0°-ից վեր բարձրանալիս, իսկ ամռան սկիզբն ու ավարտը պայմանավորված են 15°-ով: Գարունն ու աշունը գտնվում են 0°-ից 15°-ի սահմաններում [3]:

Սյունիքի մարզում հողային ծածկույթը բազմազան է, որը պայմանավորված է տեղի բարձրությունների, ռելիեֆի ձևերի, կլիմայի, բուսականության և հողառաջացման մյուս գործոնների մեծ տարբերություններով:

Մարզի հարավային մասում բնական նախադրյալները նպաստում են լեռնամետալուրգիական և մասամբ փայտամշակման արտադրությանը, իսկ հյուսիսային մասում՝ ջրաէներգետիկայի և գյուղատնտեսության զարգացմանը:

Սյունիքը մեր հանրապետության ամենաուրբանիզացված և առավել նոսր բնակեցված մարզերից մեկն է. բնակչության խտությունը կազմում է 36 մարդ/կմ<sup>2</sup>, իսկ գյուղական բնակչության խտությունը՝ 10,6 մարդ/կմ<sup>2</sup>: Բնակչությունը տեղաբաշխված է խիստ անհավասարաչափ: Դա պայմանավորված է տնտեսության զարգացման մակարդակի և կառուցվածքի տարածքային տարբերություններով, բնական պայմանների և հատկապես ռելիեֆի բնույթով, տարածքի տնտեսական յուրացման աստիճանով:

Մարզի բնակչության մեծ մասը ապրում է 700-800, 1300-1400, 1500-1600 և 1900-2000 մ բարձրություններում գտնվող հովիտներում և սարահարթերում: Նշված բարձրությունները համընկնում են գետահովիտների և սարահարթերի բարձրությունների հետ, որտեղ կան լավագույն պայմաններ կառուցապատման, ինչպես նաև տնտեսական գործունեություն ծավալելու համար [2]:

Սյունիքի մարզում էկոհամակարգերի աղտոտման պատճառ հանդիսանում են նաև կենցաղային հոսքաջրերը, որոնք առանց մաքրման լցվում են գետերը:

Ուսումնասիրության համար ընդգրկել ենք Սյունիքի մարզի Կապանի, Գորիսի, Մեղրու և Սիսիանի տարածաշրջանները: Ուսումնասիրել ենք մարդու կենցաղային գործունեության առանձնահատկությունները, և տվել վերջինիս հե-տևանքով շրջակա միջավայր ներմուծված կենսածին տարրերի՝ մասնավորապես ազոտի և ֆոսֆորի քանակական բնութագրերը:

**Նյութ և մեթոդ:** Մարդկային կենցաղային գործունեության հետևանքով միջավայր ներմուծվող կենսածին տարրերի քանակական բնութագիրը բացահայտելու համար օգտվել ենք Վոլենվալդերի մեթոդիկայից: Ըստ որի՝ քաղաքաբնակ շրջաններում յուրաքանչյուր մարդու տնտեսական գործունեության հետևանքով մեկ օրում միջավայր է անցնում 28 գ ազոտ և 2,8 գ ֆոսֆոր [5-6], իսկ գյուղական շրջաններում՝ համապատասխանաբար 14 գ և 1,4 գ [6]: Հետևաբար, մեկ տարվա ընթացքում շրջակա միջավայր ներմուծվող ազոտի և ֆոսֆորի քանակը կլինի՝

$$N_{տ} = 365 N_{օր} \quad (1)$$

$$P_{տ} = 365 P_{օր} \quad (2):$$

**Արդյունքներ և քննարկում:** Սյունիքի մարզն ունի 113 համայնք, որից քաղաքային՝ 7, գյուղական՝ 106: Մարզի բնակավայրերի թիվը 135 է, որից՝ սահմանամերձ, լեռնային և բարձր լեռնային են հանդիսանում 102-ը: Ըստ Սյունիքի մարզի ազգային վիճակագրական ծառայության տվյալների՝ այս տարածքում բնակվում է 152,9 հազ. մարդ (աղ. 1):

**Աղյուսակ 1.** Սյունիքի մարզի բնակչության թվաքանակն ըստ տարածաշրջանների՝ 2006-2009թթ. (հազ. մարդ)

| Տարածաշրջան | 2006թ. |       |       | 2007թ. |       |       | 2008թ. |       |       | 2009թ. |       |       |
|-------------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|
|             | քաղ.   | գյուղ | ընդ.  | քաղ.   | գյուղ | ընդ.  | քաղ.   | գյուղ | ընդ.  | քաղ.   | գյուղ | ընդ.  |
| Կապան       | 54,0   | 8,4   | 62,4  | 53,9   | 8,4   | 62,3  | 54,0   | 8,4   | 62,4  | 54,0   | 8,3   | 62,3  |
| Գորիս       | 23,2   | 21,4  | 44,6  | 23,2   | 21,4  | 44,6  | 23,1   | 21,5  | 44,6  | 23,0   | 21,6  | 44,6  |
| Մեղրի       | 9,6    | 2,6   | 12,2  | 9,6    | 2,6   | 12,2  | 9,6    | 2,6   | 12,2  | 9,7    | 2,6   | 12,3  |
| Սիսիան      | 17,0   | 16,8  | 33,8  | 17,0   | 16,8  | 33,8  | 17,0   | 16,6  | 33,6  | 17,0   | 16,7  | 33,7  |
| Ընդամենը՝   | 103,8  | 49,2  | 153,0 | 103,7  | 49,2  | 152,9 | 103,7  | 49,1  | 152,8 | 103,7  | 49,2  | 152,9 |

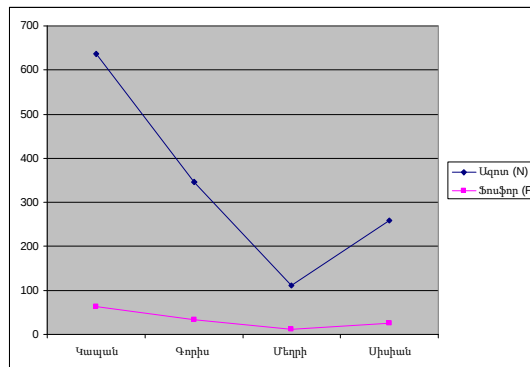
Ըստ աղ. 1-ի տվյալների՝ Սյունիքի մարզի բոլոր համայնքներում նկատվում են բնակչության թվաքանակի աննշան փոփոխություններ:

Համաձայն Վոլենվալդերի բանաձևերի հաշվարկել ենք՝ այս տարածքում բնակչության կենցաղային գործունեության հետևանքով շրջակա միջավայր անցնող ազոտի և ֆոսֆորի քանակությունը (աղ. 2):

Քանի որ, Սյունիքի տարածաշրջաններում 2006-2009 թթ. բնակչության թվաքանակը գրեթե չի փոփոխվել, հետևաբար կարելի է հաշվել յուրաքանչյուր տարածաշրջանում բնակչության թվաքանակի միջին արժեքը և գրաֆիկորեն ներկայացնել մարդու կենցաղային գործունեության հետևանքով միջավայր անցած ազոտի և ֆոսֆորի քանակները բոլոր տարածաշրջաններում մեկ տարվա ընթացքում (նկ. 1):

**Աղյուսակ 2.** Սյունիքի մարզի տարածաշրջաններում մարդու կենցաղային գործունեության հետևանքով շրջակա միջավայր ներմուծվող ազոտի (N) և ֆոսֆորի (P) քանակները, տ/տարի, 2006-2009թթ.

| Տարածաշրջան | Տարեթիվը | Քաղաքային շրջաններ |       | Գյուղական շրջաններ |       | Ընդամենը |       |
|-------------|----------|--------------------|-------|--------------------|-------|----------|-------|
|             |          | N                  | P     | N                  | P     | N        | P     |
| Կապան       | 2006     | 551,88             | 55,19 | 85,85              | 8,58  | 637,28   | 63,73 |
|             | 2007     | 550,86             | 55,09 | 85,85              | 8,58  | 636,71   | 63,67 |
|             | 2008     | 551,88             | 55,19 | 85,85              | 8,58  | 637,28   | 63,73 |
|             | 2009     | 551,88             | 55,19 | 84,83              | 8,48  | 636,71   | 63,67 |
| Գորիս       | 2006     | 237,10             | 23,71 | 109,35             | 10,94 | 346,46   | 34,65 |
|             | 2007     | 237,10             | 23,71 | 109,35             | 10,94 | 346,46   | 34,65 |
|             | 2008     | 236,08             | 23,61 | 109,87             | 10,99 | 345,95   | 34,59 |
|             | 2009     | 235,06             | 23,51 | 110,38             | 11,04 | 345,44   | 34,54 |
| Մեղրի       | 2006     | 98,11              | 9,81  | 13,29              | 1,33  | 111,40   | 11,14 |
|             | 2007     | 98,11              | 9,81  | 13,29              | 1,33  | 111,40   | 11,14 |
|             | 2008     | 98,11              | 9,81  | 13,29              | 1,33  | 111,40   | 11,14 |
|             | 2009     | 99,13              | 9,91  | 13,29              | 1,33  | 112,42   | 11,24 |
| Միսիս       | 2006     | 173,74             | 17,37 | 85,85              | 8,58  | 259,59   | 25,96 |
|             | 2007     | 173,74             | 17,37 | 85,8               | 8,58  | 259,59   | 25,96 |
|             | 2008     | 173,74             | 17,37 | 84,83              | 8,48  | 258,57   | 25,86 |
|             | 2009     | 173,74             | 17,37 | 85,34              | 8,53  | 259,08   | 25,91 |



**Նկ. 1.** Մարդու կենցաղային գործունեության հետևանքով միջավայր անցած ազոտի և ֆոսֆորի քանակների տարեկան միջին արժեքները Սյունիքի մարզի տարածաշրջաններում, տ/տարի, 2006-2009 թթ.

Գրաֆիկից հետևում է, որ մարդու կենցաղային գործունեության հետևանքով ազոտի և ֆոսֆորի ամենամեծ քանակները ներմուծվում են շրջակա միջավայր Կապանի տարածաշրջանում, իսկ ամենափոքրը՝ Մեղրու տարածաշրջանում: Մարզի տարածքում հոսքաջրերի հեռացման և մշակման պատշաճ մակարդակ ապահովելու համար առաջարկվում է.

1. վերակառուցել գոյություն ունեցող հոսքաջրերի մաքրման գործարանները և կառուցել նորերը,
2. իրականացնել հոսքաջրային ցանցերի վերականգնում և տեխնիկական վերասարքավորում, ինչպես նաև աշխատակազմի ուսուցում:

### ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. ՀՀ ազգային վիճակագրական ծառայություն:  
On line: [http://armstat.am/file/article/nasel\\_1\\_01\\_09.pdf](http://armstat.am/file/article/nasel_1_01_09.pdf)
2. Մանասյան Մ.Գ, և ուրիշներ, Սյունիքի մարզ (բնությունը, բնակչությունը, տնտեսությունը), Երևան: ԵՊՀ հրատ., 2002, 155 էջ:
3. Մկրտչյան Ռ.Ս., Հայրապետյան Ֆ.Փ., Հայաստանի բնության օրացույց: Երևան, 266 էջ, 1976:
4. "Идентификация приоритетных территорий для создания биосферных резерватов, построение баз данных, подготовка гис, и разработка проектных документов для стран южного кавказа" Ереван, 2004.  
On line: [/www.ecocentre.am/projects/mab/Final Report of Project,pdf](http://www.ecocentre.am/projects/mab/Final%20Report%20of%20Project.pdf)
5. Россоломо Л.Л., Изменение лимнических экосистем под влиянием антропо-генного фактора, М. "Наука", 1977.
6. Vollenweider R.A. Scientific fundamental of the eutrophication of lakes and flowing waters with particular reference to nitrogen and phosphorus effect in eutrophication. Teck. rep. organiz, econom, co-oper. and devel., p. 159, 1968.

Մտագրվել է 25.12.2009



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 1(62), 2010

## ՀԱՏԱՊՏՂԱՅԻՆ ԿԵՆԻՆ (*Taxus baccata* L.) ԴԵԲԵԴ ԳԵՏԻ ԱՎԱԶԱՆՈՒՄ

Ժ.Հ. ՎԱՐԴԱՆՅԱՆ<sup>1</sup>, Վ.Լ. ԲԱԴՅԱՆՅԱՆ<sup>2</sup>, Ռ.Ա. ՀՈՎՍԵՓՅԱՆ<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ՀՀ ԳԱԱ Բուսաբանության ինստիտուտ

<sup>2</sup> ՀՀ ԲՆ Արգելոցապարկային համալիր ՊՈԱԿ

<sup>3</sup> ՀՀ ԳԱԱ Հնագիտության և ազգագրության ինստիտուտ,  
E-mail: badalyan\_vahan@yahoo.com

Ուսումնասիրություններն իրականացվել են Դեբեդ գետի ավազանում (Հաղպատ վտակ): Արդյունքները վկայում են, որ տվյալ տարածաշրջանում հատապտղային կենին (*Taxus baccata* L.) առնվազն 300 տարեկան է: Հնդիանուր առամբ այս տեսակը գտնվում է ղեգրադացված վիճակում, ինչի վկայությունն են ծառերի բների փտած և քայքայված լինելն ու զագայների բացակայությունը: Բնական վերականգնման հետ կապված նույնպես առկա են խնդիրներ, քանի որ ուսումնասիրությունների ժամանակ հանդիպել է միայն մեկ 1-2 տարեկան 5 սմ բարձրությամբ սերմնաբուսակ: Այս տեսակի պահպանման և վերականգնման ուղղությամբ անհրաժեշտ է կատարել գործուն քայլեր, այլապես մեր կողմից բացահայտված այս նոր աճելավայրի մասին պահպանված միակ վկայությունը այս հրապարակումը կլինի:

Կենի - ասեղնատերև - ռելիկտ - կենսաբազմազանություն

Результаты исследований показывают, что в бассейне реки Дебед (пр. Ахпат) тисс ягодный (*Taxus baccata* L.) растет не менее 300 лет. В целом этот вид находится в деградированном состоянии, о чем свидетельствуют гнилые пни и отсутствие верхушек. Есть проблемы также с естественным возобновлением, т.к. во время исследований был обнаружен только один 1-2-летний сеянец высотой 5 см. Для охраны и восстановления этого вида необходимы серьезные мероприятия.

Тисс - хвоя - реликт – биоразнообразие

As a result of River field investigations in the valley of Haghpata River (tributary of Debed River), at altitudes 1000-1075 m above sea level, several approximately 300 year-old *Taxus baccata* trees have been recorded for the first time. In the investigated area the *Taxus* trees are growing in mixed forest (with species of *Fagus*, *Quercus*, *Carpinus* etc.), on slopes of various orientation. The recorded plants are in bad situation: they have been cut for at least several times, the most of plants lack top and the stems decay because of fungal infections caused by many cuts. The natural restoration of *Taxus* is not satisfying as well; we noticed only one 1-2 year old seedling with 5 cm height in this territory. Above mentioned situation otherwise suggests that it is necessary to protect *Taxus baccata* in this area, else this publication will remain as the last evidence of *Taxus* trees growing in the middle of Debed River basin.

Yew - conifer - relic - biodiversity

Հատապտղային կենին (*Taxus baccata* L.) պատկանում է կենազգիների (Taxaceae) ընտանիքին: *Taxus* ցեղի սակավաթիվ (8 տեսակ) ներկայացուցիչներն ունեն

տարածման բավական ընդարձակ արեալ՝ հանդիպում են Եվրոպայում, Արևելյան Ասիայում և Հյուսիսային Ամերիկայում:

Հատապտղային կենին ռեկլիտային ծառատեսակ է, այն լայն տարածում է ունեցել հնագույն ժամանակներում [3-5], սակայն կլիմայական փոփոխությունների, իսկ հետագայում նաև մարդու անխնա օգտագործման հետևանքով տեղի է ունեցել արեալի զգալի կրճատում: Ներկայումս անհամեմատ փոքր ծառատներով ու հատուկենտ ծառերով, հատապտղային կենին պահպանվել է Արևմտյան Եվրոպայի գրեթե բոլոր անտառային շրջաններում, Աֆրիկայի հյուսիսային մասերում, Ղրիմում, Հիմալայներում և Կովկասում:

Հայաստանում այս տեսակի տարածվածության էկոլոգո-ցենոտիկ առանձնահատկություններին նվիրված ուսումնասիրություններ կատարվել են դեռևս 20-րդ դարի 40-ականներին Մախատաձեի և Տրոյիցկու կողմից [11]: Հետագայում հատապտղային կենու ուսումնասիրմամբ զբաղվել են Լազավոյը, Մուլքիջանյանը, Խուրշուդյանը, Աբրահամյանը և այլոք [1,2,4], որոնց աշխատանքների արդյունքները վկայում են, որ կենին հանդիպում է Հայաստանում հյուսիս-արևելյան՝ Դիլիջանի, Իջևանի, Նոյեմբերյանի, Բերդի և հարավ-արևելյան՝ Կապանի տարածաշրջաններում: Հյուսիսային շրջաններում հանդիպում է հիմնականում հաճախեմու, հազվադեպ կաղնու և բոխու, իսկ Ջանգեզուրում՝ բոխու, կաղնու, հացենու խառը անտառներում, որոնցում հանդես է գալիս որպես ուղեկցող տեսակ հատուկենտ ծառերի կամ փոքր խմբերի տեսքով, հազվադեպ ունենալով գերակշռող դեր այդ համակեցություններում (Դիլիջան-գ.Աղավնավանք, Ջանգեզուր-գ.Գեղանուշ):

Հատապտղային կենին 10-25 (30)մ բարձրության մինչև 150 (250)սմ բնի տրամագծով երկտուն, հազվադեպ միատուն ծառ է [3,6]: Ասեղնատերևներն ունեն 2-3,5 սմ երկարություն, որոնք ապրում են 6-8 տարի: Կեղևը բարակ է, կարմրա-գորշավուն, սկզբում հարթ, այնուհետև ճաքճքվում է, անջատվում թիթեղներով: Պտղաբերում է ամեն տարի. բաց տարածքներում՝ սկսած 20-30, անտառում՝ 70-120 տարեկանից մինչև գերհասուն տարիք: Ծաղկում է ապրիլ-մայիս ամիսներին: Փռնոտումը տեղի է ունենում քամու միջոցով: Հասունանում է ,ծաղկման տարին՝ օգոստոս-սեպտեմբեր ամիսներին: Սերմերը ձվաձև են, սրածայր: Սերմնակիցը (պտղամիսը) վառ կարմիր է, գավաթանման, սերմը ընդգրկում է մինչև գագաթը, սակայն այն չի սերտաճում և սերմը չի պարփակում իր մեջ: Հանգստի ժամանակահատվածը սերմերի մոտ տևում է 20-32 ամիս: Կենին հանդիսանում է շատ երկարակյաց ծառատեսակ՝ ապրում է մինչև 1000, հազվադեպ 4000 տարի:

Սովորաբար է, սակայն կարող է աճել նաև ինտենսիվ լույսի պայմաններում:

Լավ է հարմարվում թույլ թթվային և չեզոք ռեակցիա ունեցող կավճային ու կրային հողերում, սակայն պահանջում է հարուստ, խոնավ հողեր: Դժվար է հարմարվում հողի ճահճացմանը:

Խառը անտառներում կենին հիմնականում հանդես է գալիս որպես ուղեկցող տեսակ, հազվադեպ հանդիպում է նաև բաց տարածքներում: Կենու ծառատներում լուսային պայմանների անբավարարության պատճառով ենթանտառը գրեթե բացակայում է, թույլ է զարգանում խոտածածկը, որը, հիմնականում, կազմված է պտերներից, հացազգի լայնատերև խոտաբույսերից: Կենին լավ է դիմակայում օդում գազի և ծխի առկայության, կարող է նորմալ աճել ու զարգանալ 25-30° սառնամանիքների պայմաններում:

Դա թունավոր ծառատեսակ է, թունավոր են հատկապես ասեղնատերևները, ընդ որում, որքան ասեղնատերևները հին են, այնքան նրանցում թույնի պարունակությունը շատ է լինում կարող է մահվան պատճառ հանդիսանալ [3, 8]: Միայն ,պտղամիսն է, որ թույն չի պարունակում:

Ֆիտոնցիդներ արտադրելու շնորհիվ կենին ունի մանրէասպան հատկություն:

Բնափայտը չափազանց ամուր է, ծանր (0.88 գ/սմ<sup>3</sup>), ճկուն և մանրաշերտ: Բնափայտի յուրահատուկ կարմրա-գորշավուն (կարմրա-դեղնավուն) գույնի շնորհիվ կենուն հաճախ անվանում են նաև կարմրածառ (բզենի, գեղձի), իսկ Ալավերդիում, որտեղ և կատարվել են մեր ուսումնասիրությունները, այս ծառատեսակին անվանում են ,տուտիվարիե: Հրաշալի հղկվում է, շատ բարձր է գնահատվում հատկապես բարձրորակ կահույքի արտադրության մեջ:

**Նյութ և մեթոդ:** Աշխատանքի համար նյութ է ծառայել Դեբեդ գետի Հաղպատ վտակի ավազանը: Տարածքի ընտրությունը պայմանավորված է տարածաշրջանի անտառածածկի պայմանների վերլուծությամբ՝ համեմատականներ են անց կացվել մյուս տարածքների՝ մասնավորապես, Նոյեմբերյանի շրջանի Ոսկեպար գյուղի հարակից տարածքում գտնվող կենու պուրակի անտառածածկի պայմանների հետ, և հավանական համարել կենու առկայություն վերոհիշյալ հատվածում:

Ուսումնասիրություններն իրականացվել են 2009թ-ին երթուղային եղանակով, որը համադրվել է փորձահրապարակներով ուսումնասիրության հետ: Հնարավորության սահմաններում ուսումնասիրվել է բացահայտված ծառերի շրջակա բույսերի տեսակային կազմը [6, 10], կատարվել է տվյալ ծառուտի անտառգնահատման ցուցանիշների որոշման աշխատանքներ [7,12]:

**Արդյունքներ և քննարկում:** Հետազոտվող տարածքի բարենպաստ անտառածածկի պայմանների շնորհիվ ստեղծվել է հաճախեմու (*Fagus*), կաղնու (*Quercus*) և բոխու (*Carpinus*) գերակշռությամբ խառը անտառներ, որտեղ գլխավոր անտառակազմող տեսակներին ուղեկցում են թխկին (*Acer*), հացենին (*Fraxinus*), լորենին (*Tilia*):

Հազվադեպ հանդիպում են նաև արոսենու (*Sorbus*), գիհու (*Juniperus*) կենու առանձնյակներ: Հատապտղային կենին այստեղ հանդես է գալիս հիմնականում փոքրիկ խմբերի մենածառերի տեսքով (աղ.1): Աղյուսակում ներկայացված են ծառերի գտնվելու կոորդինատները, լանջի բնութագրերը, ծառերի քանակը յուրաքանչյուր ծառի տրամագիծն ու բարձրությունը: Ներկայացված տվյալների վերլուծությունից կարելի է ասել, որ կենին հանդիպում է գրեթե բոլոր կողմնադրությունների զառիթափ լանջերի միջին և ստորին հատվածներում, որտեղ առկա են այս տեսակի աճման համար առավել բարենպաստ պայմաններ:



**Նկ.1** Հատապտղային կենին Դեբեդ գետի ավազանում (Օգոստոս, 2009թ.)

Հայտնաբերված գրեթե բոլոր կենիների վրա ակնհայտ էր անթրոպոգեն ազդեցություն՝ վնասված, հատված ծառեր ու զազաթներ:

Ծառերի մոտ առկա էր բների փտածություն, ինչի պատճառով հնարավոր չէր ճշգրիտ որոշել տարիքը, սակայն չփտած հատվածի միջին և ընթացիկ աճերի վերլուծությունից կարելի է ենթադրել, որ տրամագծի 1 սմ աճը տեղի է ունենում մոտ 10 տարվա ընթացքում ծառերի հնարավոր առավելագույն տարիքը կարող է կազմել 300-350 տ:

Ուսումնասիրության օբյեկտ են հանդիսացել նաև այն ծառուտները, որոնց կազմում առկա էին կենիներ (աղ.2): Բոլոր ծառուտներում ենթանտառի կազմում հանդիպում էին կտակենու (*Sambucus*), հոնի (*Cornus*), մոշի (*Rubus*) ոչ մեծ քանակության թփեր, միայն ցածր լրիվությամբ ծառուտներում մոշի առատություն էր նկատվում:

**Աղյուսակ 1.** Հատապտղային կենու դենդրոմետրիկ ցուցանիշները ըստ լեռնագրական պայմանների

| N | Աշխարհագրական կոորդինատները             | Լանջի բնութագիրը                                              | Ծառերի քանակը                | Բնի տրամագիծը, սմ       | Ծառի բարձրությունը, մ |
|---|-----------------------------------------|---------------------------------------------------------------|------------------------------|-------------------------|-----------------------|
| 1 | 41°04'03"<br>044°42'43"<br>ԾՄԲ - 1025 մ | հա 45°, թույլ էռոզացված, լանջի ստորին հատված                  | 3                            | 31<br>26<br>26          | 5.0<br>5.0<br>3.5     |
| 2 | 41°04'01"<br>044°42'39"<br>ԾՄԲ - 1050 մ | հա 45°, թույլ էռոզացված, լանջի միջին հատված                   | 1                            | 32                      | 6.5                   |
| 3 | 41°03'49"<br>044°42'44"<br>ԾՄԲ - 1030 մ | ալ 60°, ուժեղ էռոզացված, լանջի ստորին հատված                  | 1 /ընկած/<br>4 մցո           | 20<br>1.0-2.5           | -<br>1.5-3.0          |
| 4 | 41°03'46"<br>044°42'44"<br>ԾՄԲ - 1050 մ | հա - ալ 40°-50°, թույլ էռոզացված, լանջի ստորին և միջին հատված | 2                            | 30<br>24                | 5.0<br>6.5            |
| 5 | 41°03'40"<br>044°42'54"<br>ԾՄԲ - 1075 մ | հա - ալ 50°, թույլ էռոզացված, լանջի միջին հատված              | 1<br>3 կոճղ<br>6 մցո. և կճղ. | 14<br>26, 30, 30<br>2-5 | 5.0<br>-<br>2.0-3.0   |

**Ծանոթություն** - ԾՄԲ-ծովի մակարդակից բարձրություն, հա-հարավային, հս-հյուսիսային, ալ-արևելյան, ալ-արևմտյան, մցո. և կճղ.- մացառ և կոճղաշիվ:

**Աղյուսակ 2.** Կենու մասնակցությամբ ծառուտների դենդրոմետրիկ և անտառզնահատման ցուցանիշները

| N | Ծառուտի կազմը              | Տեսակը                 | Դենդրոմետրիկ ցուցանիշները  |                           |                              | Անտառզնահատման ցուցանիշները |              |              |        |
|---|----------------------------|------------------------|----------------------------|---------------------------|------------------------------|-----------------------------|--------------|--------------|--------|
|   |                            |                        | Տրամագիծը, սմ              | Բարձրությունը, մ          | Տարիքը, տարի                 | Բնիտեսակը                   | Լրիվությունը | Մատուցող     |        |
|   |                            |                        |                            |                           |                              |                             |              | Կազմը        | Քանակ  |
| 1 | 5կ5լ                       | կ<br>լ                 | 40<br>36                   | 14<br>14                  | 100<br>100                   | IV                          | 0.2          | 5բ3հց1կ1թխ   | 10 000 |
| 2 | 4հ4լ2բ եզ կենի             | հ<br>լ<br>բ            | 48<br>32<br>36             | 23<br>20<br>20            | 140<br>100<br>120            | III                         | 0.6          | 3հ4բ3լ       | 400    |
| 3 | 8հ2բ եզ կենի               | հ<br>բ                 | 48<br>32                   | 16<br>14                  | 140<br>120                   | IV<br>III                   | 0.3          | 6բ2հ2հց      | 1 000  |
| 4 | 5թխ3բ1հ1լ եզ կենի, արոսենի | թխ<br>բ<br>հ<br>լ      | 44<br>28<br>44<br>16       | 22<br>13<br>22<br>10      | 130<br>70<br>130<br>40       | III                         | 0.6          | 4թխ3լ3բ      | 500    |
| 5 | 3կ3հց2լ1բ1ղ եզ կենի        | կ<br>հց<br>լ<br>բ<br>ղ | 26<br>22<br>40<br>30<br>14 | 16<br>14<br>17<br>15<br>7 | 100<br>70<br>110<br>100<br>- | IV                          | 0.5          | 3թխ3հց2բ1ղ1կ | 800    |

**Ծանոթություն** - կ-կաղնի, հ-հաճարենի, Լ-լորենի, բ-բոխի, թխ-թխկի, հց-հացենի, ղ-ղաժի, եզ-եզակի:

Մատղաշի ուսումնասիրության համար ընտրվել են 100 մ<sup>2</sup> մակերեսով փորձահրապարակներ, որի տվյալները բերված են աղ. 2-ում, սակայն հարկ է նշել, որ ուսումնասիրությունների ժամանակ միայն II-րդ ծառուտում կենու մեկ սերմնաբուսակ հայտնաբերեցինք: Կենդանի ծածկոցի առկայությունը, առատությունը և տեսակային կազմը պայմանավորված էր սաղարթի միակցվածությամբ, որի կազմում հանդիպում են հիմնականում քարավույտ երփներենգ (*Coronilla varia*), թունաթափ սուր (*Cynanchum acutum*), եղինջ այրող (*Urtica urens*), կանթեղախոտ (*Chelidonium sp.*), վիկ թավոտ (*Vicia villosa*), սնդրիկ (*Polygonatum sp.*), պտեր (*Polypodium sp.*) և այլն:

Ուսումնասիրությունների ընթացքում մեզ աջակցել են անտառտնտեսության նախկին ավագ որսագետ Գագիկ Անտոնյանը և նրա կինը՝ Անահիտ Անտոնյանը:

#### ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. Գրիգորյան Ս.Ս., Վարդանյան Շ.Հ., Վարդանյան Դ.Վ. Հայաստանի դենդրոֆլորայի մշտադալար տեսակները, դրանց պահպանության վիճակն ու վերարտադրության ուղիները, Հայաստանի ֆլորայի բուսական ծածկույթի վիճակն ու պահպանությունը ԵրԺան, էջ 152-165, 1984:
2. Խուրշուդյան Պ.Ս. Պահպանենք ռելիկտային կենու անտառները, Հայաստանի բնություն, №1, էջ 47-48, 1962:
3. Վարդանյան Շ.Հ. Ծառագիտություն, Եր. 2005.
4. Артамонов В.И. Редкие и исчезающие растения, М. 1989.
5. Варданян Ж.А. Деревья и кустарники Армении в природе и культуре, Ереван, 2003.
6. Дендрофлора Кавказа, т-1, Тб. 1959.
7. Деревья и кустарники СССР, т-1, М.-Л, 1949.
8. Магакьян А.К. Растительность Армянской ССР, М.-Л., 1941.
9. Сеннов С.Н. Лесоведение и лесоводство, М., 2008.
10. Сосновский Д.Н., Махатадзе Л.Б. Краткий определитель деревьев и кустарников Армянской ССР, Ереван, 1950.
11. Троицкий Н.А., Тисс в Дилижанском районе Арм.ССР, Сб. науч. тр. бот. общ. 2, стр.33-42, 1939.
12. Ярошенко П.Д. Геоботаника, М.-Л. 1961.

Ստացվել է 10.12.2009



Биол. журн. Армении, 1 (62), 2010

## ИЗОТЕРМА СОВМЕСТНОЙ АДСОРБЦИИ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ ЛИГАНДОВ НА ДНК ПРИ МАЛЫХ ЗАПОЛНЕНИЯХ

А.В. АРАКЕЛЯН

Ереванский государственный университет, биологический факультет,  
кафедра биофизики, E.mail: anush\_arakelyan@mail.ru

Исследована совместная адсорбция обратимо и необратимо связывающихся лигандов с ДНК. В области малых заполнений получена изотерма, которая в зависимости от значения параметров адсорбции может описать кривые адсорбции с одним, двумя и тремя линейными участками. Сопоставление изотермы с экспериментальными кривыми позволяет получить такие важные параметры адсорбции как константа связывания, число мест на ДНК, с которыми связывается одна молекула лиганда, а также доля ДНК, которая трансформировалась при необратимом связывании с ней лигандом.

*Адсорбция лигандов – ДНК - изотерма адсорбции - константа  
связывания – область малых заполнений*

Աշխատանքում ուսումնասիրվել է դարձելիորեն և ոչ դարձելիորեն կապվող լիգանդների կապումը ԴՆԹ-ի հետ: Փոքր հագեցումների տիրույթում ստացվել է իզոթերմ, որը, կապման պարամետրերի արժեքներից կախված, կարող է նկարագրել մեկ, երկու և երեք գծային հատվածների հետ կապման կորերը: Իզոթերմի համեմատությունը փորձարարականորեն ստացված կորերի հետ թույլ է տալիս ստանալ կապման այնպիսի կարևոր պարամետրեր, ինչպիսիք են կապման հաստատունը, ԴՆԹ-ի վրա մեկ մոլեկուլ լիգանդի կապման տեղերի թիվը, ինչպես նաև ԴՆԹ-ի այն մասը, որը ձևափոխվել է ոչ դարձելիորեն կապվող լիգանդի հետ կապման արդյունքում:

*Լիգանդների կապում - ԴՆԹ (կապման կոր (կապման հաստատուն - փոքր  
հագեցումների տիրույթ)*

Joint adsorption of reversible and irreversible binding ligands with DNA has been investigated in present work. In the area of small fillings the isotherm is obtained which may describe adsorptions curve with one, two and three linear sites depending on meanings of adsorption parameters. Comparison of an isotherm with experimental curves allows obtaining such important parameters of adsorption as a binding constant and number of binding sites as well as the part of DNA which was transformed at irreversible binding with ligand.

*Adsorption of ligands – DNA - adsorption isotherm - binding constant – area  
of small fillings*

В большинстве работ, посвященных проблеме адсорбции лигандов на ДНК, исследуется адсорбция одного типа лигандов [2-5]. Хотя очевидно, что в реальной клеточной системе, скорее всего, это является исключением, чем правилом. Анализ экспериментальных данных при совместной адсорбции различных типов лигандов на ДНК с целью определения параметров адсорбции представляет большую трудность. В первую очередь, это связано с отсутствием простых формул. Следует отметить, что хотя проблеме адсорбции лигандов на ДНК посвящено большое число теоретических работ [1,6-8,10,11], однако применение результатов этих работ для анализа экспериментальных кривых часто не приводит к желательному эффекту. В данной работе будет показано, что в области малых заполнений можно получить изотерму адсорбции при совместной адсорбции различных типов лигандов на ДНК, которая имеет относительно простой вид. Сопоставление этой изотермы адсорбции с экспериментальными кривыми позволяет получить такие важные параметры адсорбции как константа связывания, число мест на ДНК, с которыми связывается одна молекула лиганда, а также доля ДНК, которая трансформировалась при необратимом связывании с ней лиганда.

**Теоретическая часть.** В случае, когда на ДНК адсорбируется необратимо связывающийся лиганд, некоторая доля ДНК может трансформироваться, и на трансформированном участке ДНК изменяются как константа связывания, так и число мест на ДНК, с которыми связывается одна молекула обратимо связывающегося лиганда (этидиум бромид). Например, в случае связывания молекулы *cis*-DDP с ДНК при определенном соотношении числа молекул *cis*-DDP по отношению к числу пар оснований ДНК на ДНК образуются кольцевые участки [9]. В отличие от работы [9], в данной работе рассмотрим более общий случай, когда в результате трансформации структуры ДНК при связывании с необратимо связывающимся лигандом возникают два новых места связывания с различными параметрами связывания, т.е. помимо параметров связывания на линейном (не кольцевом) участке (константы связывания  $K_1$  и число мест на ДНК, с которыми связывается одна молекула лиганда  $n_1$ ) на ДНК появляются места связывания с ( $K_2, n_2$ ) и ( $K_3, n_3$ ). В этом случае изотерма обратимо связывающегося лиганда с ДНК будет иметь следующий вид

$$\frac{r}{K_1 c_f} = \frac{1 - p_2 - p_3}{1 + \alpha_1 K_1 c_f} + \frac{p_2 \gamma_2}{1 + \alpha_2 \gamma_2 K_1 c_f} + \frac{p_3 \gamma_3}{1 + \alpha_3 \gamma_3 K_1 c_f} \quad (1)$$

$$\alpha_1 = 2n_1 - 1, \quad \alpha_2 = 2n_2 - 1, \quad \alpha_3 = 2n_3 - 1,$$

$$\gamma_2 = K_2 / K_1, \quad \gamma_3 = K_3 / K_1.$$

$$p_1 + p_2 + p_3 = 1,$$

где  $c_f$  - число свободных лигандов в растворе;  $r$  - число адсорбированных лигандов в расчете на одну пару оснований;  $p_1$ ,  $p_2$  и  $p_3$  доли ДНК с соответствующими значениями параметров адсорбции ( $K_1, n_1$ ), ( $K_2, n_2$ ) и ( $K_3, n_3$ ). Уравнение (1) удобно решить численно, а затем результат представить в координатах Скотчарда ( $r / (K_1 c_f)$  от  $r$ ). Возможно, что лишь некоторая доля кольцевых участков, расположенных вблизи мест связывания *cis*-DDP с ДНК, трансформируется и приобретает новые адсорбционные свойства. Остальная же часть кольцевой ДНК будет иметь такие же параметры связывания, как и ДНК на линейном (не кольцевом) участке. В этом случае можно получить следующую изотерму:

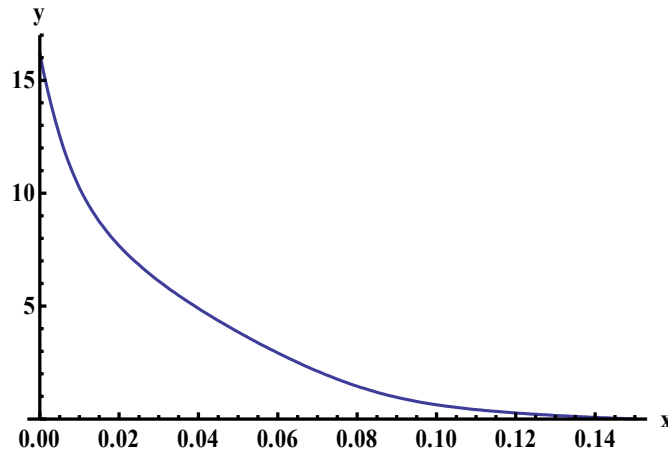
$$r = \frac{(p_1 + p_r p_{r1}) K_1 c_f}{1 + (2n_1 - 1) K_1 c_f} + \frac{p_r p_{r3} K_3 c_f}{1 + (2n_3 - 1) K_3 c_f},$$

$$p_1 + p_r = 1$$

$$p_{r1} + p_{r3} = 1$$
(2)

где  $p_1$  - доля ДНК на линейном участке с параметрами адсорбции ( $K_1, n_1$ ),  $p_r$  - доля ДНК на кольцевом участке,  $p_{r1}$  - доля ДНК кольцевого участка с параметрами адсорбции ( $K_1, n_1$ ),  $p_{r3}$  - доля ДНК кольцевого участка с параметрами адсорбции ( $K_3, n_3$ ).

**Результаты и обсуждение.** В подавляющем большинстве случаев для объяснения нелинейности и “излома” изотермы адсорбции в области малых заполнений принимается, что ДНК содержит несколько (по крайней мере два) различных мест связывания с различными параметрами связывания. В случае с двумя различными местами связывания приближенный анализ и сопоставление результатов эксперимента с теоретической кривой (прямая в координатах Скетчарда) можно провести, предполагая, что параметры этих мест связывания сильно различаются. Тогда изотерму адсорбции с “изломом” обрабатывают как две самостоятельные прямые и определяют параметры адсорбции. Однако следует отметить, что в подавляющем большинстве случаев параметры адсорбции на этих местах связывания не сильно различаются, и указанный способ анализа экспериментальных изотерм и определение параметров адсорбции не корректен. Анализ полученной в данной работе изотермы адсорбции (1) показывает, что нелинейные изотермы адсорбции, включающие в себя и “излом”, можно описать единой кривой. В зависимости от параметров адсорбции изотерма (1) описывает кривые адсорбции с одним, двумя и тремя линейными участками. В качестве примера на рис.1 приведена изотерма с тремя линейными участками.



**Рис.1.** Изотерма адсорбции в координатах Скетчарда ( $y = r / (K_1 c_f)$ ,  $x = r$ ),

построена согласно (1) при следующих значениях параметров адсорбции:

А)  $n_1 = 2, n_2 = 5, n_3 = 9, \gamma_2 = 10, \gamma_3 = 90, p_1 = 0.2, p_2 = 0.7, p_3 = 0.1$

Анализ (2) показывает, что в зависимости от параметров изотерма (2) может описать кривые с одним и двумя линейными участками. Таким образом, изотерма (1) позволяет единым образом описать широкий спектр экспериментальных изотерм.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Аракелян В.Б., Арутюнян С.Г., Саркисян Г.С., Вардеванян П.О. Влияние малых концентраций *cis*-DDP на адсорбцию лигандов на ДНК. Биолог. журн. Армении, 60, 1-2, с.175-182, 2008.
2. Борисова О.Ф., Щелкина А.А., Карапетян А.Т., Суровая А.Н. Гетерогенность мест сильного связывания этидия на ДНК. Флуоресцирующие и нефлуоресцирующие комплексы. Мол. Биол., 32, с.855-862, 1998.
3. Вардеванян П.О., Антоян А.П., Манукян Г.А., Карапетян А.Т., Щелкина А.К., Борисова О.Ф. Связывание бромистого этидия с нативным и денатурированным poly(dA)-poly(dT). Мол. биол., 34, 2, с. 310-315, 2000.
4. Вардеванян П.О., Антоян А.П., Парсаданян М.А., Давтян А.Г., Карапетян А.Т. Связывание БЭ с одноцепочечной ДНК Биофизика, 48, 4, с. 644-647. 2003.
5. Веселков А.Н., Барановский С.Ф., Дымант Л.Н., Петренко Н.В., Веселков Д.А., Такер А., Дэвис Д.Б. Комплексообразование бромистого этидия с одноцепочечным некомплементарным дезокситетрануклеотидом 5'-d(ApApGpC). Мол. биол., 31, 2, с.263-273, 1997.
6. Гурский Г.В., Заседателев А.С., Волькенштейн М.В. Теория одномерной адсорбции. II. Адсорбция малых молекул на гетерополимере. Мол. биология., 6, с. 479-489, 1972.
7. Заседателев А.С., Гурский Г.В., Волькенштейн М.В. Теория одномерной адсорбции. I. Адсорбция малых молекул на гомополимере. Мол. биология., 5, с. 245-490, 1971.
8. Нечипуренко Ю.Д., Гурский Г.В. Термодинамические модели связывания лигандов с ДНК. Биофизика, 48, с. 773-796, 2003.
9. Arakelyan V.B., Babayan Yu.S., Potikyan G. J. Determination of constant rates of adsorption of ligand on DNA: Analysis of correlation function. Biomol. Str. Dyn. 18, 2, p.231-235, 2000.
10. Crothers D. Calculation of binding isotherms for heterogeneous polymers. Biopolymers, 6, p.575-584, 1968.
11. McGhee J.D. and von Hippel P.H. Theoretical Aspects of DNA-Protein Interactions: Co-operative and Non-co-operative Binding of Large Ligands to a One-dimensional Homogeneous Lattice. J. Mol. Biol., 86, p.469-489, 1974.

Поступила 26.10.2009.



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 1(62), 2010

## ԲԱԿԱՅԻՆ ՍՊԱՆԴԻ ՍՍԱՆԻՏԱՐԱԿԱՆ ԵՎ ՏՆՏԵՍԱԿԱՆ ՎՆԱՍԸ

Վ.Վ. ԱԲԴԱՀԱՄՅԱՆ, Ա.ՅՈՒ.ԱԲՈՎՅԱՆ, Ն.Է.ԽԱՉԱՏՐՅԱՆ

*Հայաստանի պետական ագրարային համալսարան*

Մսի կոմբինատի և սպանդանոցների բացակայության հետևանքով Հայաստանում ծաղկել է բակային մորթը: Այն կատարվում է առանց մասնագետի մասնակցության, որը մեծ վտանգ է ներկայացնում վարակիչ և մակարոնային հիվանդությունների տարածելու ու ազգաբնակչությանը փորձաքննություն չանցած միս և ենթամթերքներ մատուցելու ուղղությամբ: Բացի այդ, պատճառվում է նաև տնտեսական զգալի վնաս, քանի որ չեն օգտագործվում այնպիսի արժեքավոր մթերքներ, ինչպիսիք են արյունը, աղիքները, էնդոկրին և ֆերմենտատու հումքը, որոշ դեպքերում էլ մաշկը և ոսկրերը:

*Տնտեսական վնաս - բակային սպանդ - սպանդային ելունք*

Убой животных вне боенских предприятий наносит большой экономический ущерб народному хозяйству, так как в этом случае пропадает значительное количество ценных продуктов убоя (кровь, желудок, кишечник, кости, шкура, эндокринное и ферментативное сырье). Кроме того, при немелкой разделке туш на подворьях снижается их качество. В 90-х годах после приватизации всего поголовья сельскохозяйственных животных были ликвидированы почти все животноводческие хозяйства. Взамен этого в республике начал процветать подворный убой, который наносит колоссальный санитарный и экономический ущерб.

*Экономический ущерб - дворовый убой - убойный выход*

In our republic the number of cases causing diseases due to food poisoning (toxins and toxic infections) is rather big. In fact, increase in number of cases of the above mentioned diseases is noticed.

The problems in the sphere of veterinary sanitation of the republic are mainly connected with the absence of the enterprises of animal processing (meat processing and packing plant, slaughterhouse, slaughter block, etc). Therefore, in our republic animal slaughter take place in the yard and causes economic damage.

*Economic damage - house yard - slaughter yield*

Հայաստանի հանրապետությունում շուրջ 16 տարի չի գործում կենդանիների վերամշակման ոչ մի ձեռնարկություն, և կենդանիների սպանդը իրականացվում է միայն բակերում: Հայտնի է, որ բակային մորթը, որպես կանոն, կատարվում է առանց մասնագետի մասնակցության, ինչը մեծ վտանգ է ներկայացնում վարակիչ և մակարոնային հիվանդությունների տարածելու ու ազգաբնակչությանը փորձաքննություն չանցած միս և ենթամթերքներ մատուցելու ուղղությամբ: Բացի այդ, պատճառվում է նաև տնտեսական զգալի վնաս, քանի որ չեն օգտագործվում այնպիսի արժեքավոր մթերքներ, ինչպիսիք են արյունը, աղիքները, էնդոկրին և ֆերմենտատու հումքը, որոշ դեպքերում էլ՝ մաշկը, ոսկրերը և այլն [1,2]:

Ուստի մեր առջև խնդիր դրեցինք, բացի մարդկանց և կենդանիների համար ընդհանուր հանդիսացող (զոոանտրոպոգոնոզ) հիվանդությունների մակրո-, միկրո հետազոտությունների, գնահատել նաև, թե ինչպիսի տնտեսական վնաս է պատճառում բակային սպանդը ժողտնտեսությանը, երբ սպանդի ժամանակ խոտանվում է արյունը, աղիքների չմարսված պարունակյալը, աղիքները, ստամոքսը, ոսկրերը, սեռական օրգանները, շատ դեպքերում նաև կաշվեհումքը:

**Նյութ և մեթոդ:** Որպես հետազոտվող նմուշներ հանդիսացել են սպանդի ենթարկված և սպառման ներկայացված մսեղիքը նրան համապատասխանող ներքին օրգաններով (լյարդ, թոքեր, փայծաղ), ինչպես նաև վերջավորությունները, գլուխը, ավշային հանգույցները, ֆերմենտատիվ նյութերը, ստամոքսաղիքային ուղու չմարսված պարունակության հետ միասին: Հուլիսի վերաբերյալ տվյալները վերցվել են № 2 անասնաբուժական վկայականներից: Հետազոտությունները կատարվել են ՀՊԱՀ-ի անասնաբուժական սանիտարիայի, փորձաքննության և զոոհիգիենայի ամբիոնի գիտական լաբորատորիայում և Խորենացու 64 հասցեյում գտնվող ԱՍՓԼ-ում:

**Արդյունքներ և քննարկում:** Հայաստանում բացակայում է թեկուզ փոքր կարողության սպանդանոց, որտեղ կանցկացվի սպանդի մթերքների լրացուցիչ օրգանոլեպտիկ և մանրէաբանական զննում, կհաշվարկվի ենթամթերքների խոտանումից առաջացած տնտեսական վնասներն ու հաշվի կառնվեն էկոլոգիապես անվտանգ մթերքների ստացման խնդիրները:

Վերընշվածից ելնելով՝ հաշվետու ժամանակաշրջանում (01.10.2008-25.12.2008) բակային սպանդի է ենթարկվել և ուսումնասիրվել 46 մանր և 9 խոշոր եղջերավոր կենդանիների մեղիք: Տնտեսական վնասը ուսումնասիրելու համար նախապես կատարել ենք կենդանիների կշռում, որից հետո հաշվարկել արժեքավոր սպանդային մթերքների տոկոսային հարաբերությունը:

Տարբեր երկրների սննդի կազմակերպությունների և ձեռնարկությունների տվյալները վկայում են, որ տնտեսական վնասը այս ուղղությամբ հավասար է գրեթե զրոյի [3]: Սակայն մեր հետազոտությունների արդյունքները ներկայացված են հակառակ պատկերով (աղ.1):

**Աղյուսակ 1.** Կենդանիների բակային սպանդի հետազոտման արդյունքները

| Կենդանու տեսակը | Սպանդի ենթարկված կենդանիների թիվը | Բակտերիո-սկոպիա                                                          | Քաշը, կգ             |                      | Արժեքավոր մթերքների կորուստ քաշի նկատմամբ, % |        |       |             |
|-----------------|-----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------------------------------|--------|-------|-------------|
|                 |                                   |                                                                          | մինչև սպանդը (միջին) | սպանդից հետո (միջին) | Ստամոքս. աղիքային ուղի                       | արյուն | զլուխ | կաշվե-հումք |
| Մ.է.կ           | 46                                | Գոկեր Դիպլոկոկեր                                                         | 35                   | 16-17                | 16                                           | 4,5    | 10    | 10          |
| Խ.է.կ           | 9                                 | 3 գլ.կենդ. մոտ հայտն. է սպանդից-վաներ 6 գլ. եղել են նորմալ ֆիզ.-վիճակում | 195                  | 95-100               | 20                                           | 5      | 4-5   | 15          |

Ինչպես տեսնում ենք աղյուսակից, բակային մորթը հանգեցնում է մեծ տնտեսական վնասի, քանի որ այսօր բոլոր խոտանվող ենթամթերքները և աղիքները իրենցից ներկայացնում են արժեք: Հաշվի է առնվել նաև այն, որ կենդանիների մորթից հետո կատարվել է բակտերիոսկոպիկ հետազոտություն, որի արդյունքում որոշ կենդանիների մոտ հայտնաբերվեց դիպլոկոկային սեպտիցեմիա, սպլմոնելյոզ հիվանդությունները, որոնք անասնաբուժական սանիտարական փորձաքննության օրենքներից ելնելով անսահ-մանափակ սպառմանը, ենթակա չեն:

Լաբորատոր հետազոտություններից հետո անմիջապես միջոցներ են ձեռնարկվել և մեղիքը ուղարկվել է երշիկի արտադրամաս բարձր ջերմային վերամշակման, որը ևս պահանջում է ֆինանսական ծախս:

Ամփոփելով հետազոտությունների արդյունքները՝ մենք հստակ կարող ենք ներկայացնել բակային սպանդի բացասական կողմերը.

1. վարակիչ հիվանդությունների տարածում,
2. հակասանիտարական պայմաններ,
3. սպանդի կանոնների խախտում (վատ արյունաքամություն, կենդանիների մսի որակի նվազում, կենդանիների սթրես),
4. սպանդային էլունքի կորուստ,
5. մեծ տնտեսական վնաս:

## ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. Боровков М.Ф., Фролов В.П., Серко С.А. Ветеринарно-санитарная экспертиза с основами технологии и стандартизации продуктов животноводства. «Лань», 2007.
2. Шур И.В. Руководство по ветеринарно-санитарной экспертизе и гигиене переработки животных продуктов. М., 1972.
3. Mariano Domingo. La necropsia en el Ganado porcino diagnostico anatomopatologico y toma de muestras, Boehringer Ingelheim Espana, S.A., 2003.

Ստացվել է 01.02.2009



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 1(62), 2010

## ЗАСЛУЖЕННЫЙ УЧЕНЫЙ И ПЕДАГОГ

(К 80-летию со дня рождения академика НАН РА Л.Л. Осипян)



Исполнилось 80 лет со дня рождения Лии Левоновны Осипян - видного ботаника и миколога, академика НАН Армении, доктора биологических наук, профессора, почетного зав. кафедрой ботаники Ереванского государственного университета, заслуженного деятеля науки Армении.

Л.Л.Осипян окончила Ереванский государственный университет. Ее становление как специалиста ботаника-миколога началось под руководством крупного ученого в области микологии чл.-корр. АН Армении, профессора Д.Н. Тетеревниковой-Бабаян.

Трудовая деятельность Л.Л. Осипян тесно связана с Ереванским государственным университетом. Она прошла многолетний путь от лаборанта до заведующей кафедрой ботаники и декана биологического факультета. Будучи блестящим организатором науки, Лия Левоновна стояла у истоков организации научного сектора ЕГУ, в начале 1960-х годов была первым ученым секретарем научно-исследовательского сектора университета.

Осипян Л.Л. является известным ученым и прекрасным педагогом, имеющим высочайший авторитет среди микологов и ботаников не только Армении, но и многих стран, в частности республик бывшего Советского Союза.

Богатейшее творческое наследие Лии Левоновны в области микологии послужило фундаментом для успешного развития микологической школы Армении. Она является основоположником экспериментальной микологии в республике. Ею проведены ценные научные исследования в области теоретической и прикладной микологии. В круг интересов юбиляра входят вопросы систематики, флористики, экологии, физиологической активности грибов.

Осипян Л.Л. - энтузиаст всестороннего изучения мира грибов. Ее творческая активность является примером самоотверженного служения науке. Под ее руководством выросло несколько поколений микологов. Особая заслуга юбиляра – подготовка около 20 кандидатов и докторов наук, которые успешно продолжают дело своего руководителя.

Ею опубликовано более 400 научных трудов, в том числе 5 монографий, посвященных грибам, вызывающим болезни растений, порчу и токсичность пищевых продуктов, микозам человека, водным и другим грибам. Описаны новые для науки виды грибов. Ею впервые поднят вопрос о необходимости интегрирования изначально разобщенных разделов микологии, разработана классификация жизненных форм микромицетов.

Она является редактором, а также автором двух томов многотомного, капитального издания “Микофлора Армении” и в настоящее время заканчивает работу над очередным томом. Осипян Л.Л. была инициатором и организатором нескольких региональных и международных научных конференций.

Высокое чувство гражданского долга и безграничная любовь к своей стране позволили Лие Левоновне стать самоотверженным защитником природы. Она выполняет большую общественную работу в восстановлении и охране зеленых насаждений и лесов Армении, а также активно участвует во многих других природоохранных акциях.

В условиях перехода к рыночной экономике в республике Лией Левоновной была разработана концепция и проведен мониторинг по обеспечению безопасности пищевых продуктов.

Плодотворную научную и педагогическую деятельность Осипян Л.Л. успешно сочетает с общественной работой. Она является одним из активных деятелей женского движения в республике и многие годы представляла Армению в Комитете советских женщин. В настоящее время академик Осипян, будучи вице-президентом Национальной Академии Потребителей, занимается общественной деятельностью по защите прав потребителя и безопасности продуктов питания.

Осипян Лия Левоновна – бессменный член многих профессиональных и общественных организаций, редактор и член редколлегии ряда научных изданий. И везде она работает со свойственной ей энергией, чувством долга и ответственности. Ее характеризуют интеллигентность, принципиальность, доброжелательность.

Сердечно поздравляем Лию Левоновну Осипян с юбилеем, желаем ей крепкого здоровья, благополучия, долгих лет активной деятельности.

Ереванский государственный университет,  
биологический факультет.



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 1(62), 2010

## ԳԻՏՈՒԹՅԱՆԸ ԱՆՄՆԱՅՈՐԴ ՆՎԻՐՎԱԾ ԿՅԱՆՔ

(ՀՀ ԳԱԱ ակադեմիկոս Մ.Ա. Դավթյանի ծննդյան  
75 ամյակի առթիվ)



2009 թվականի հոկտեմբերի 14-ին լրացավ խոշոր կենսաքիմիկոս, գիտության վաստակավոր գործիչ, ՀՀ ԳԱԱ ակադեմիկոս Միսակ Արշամի Դավթյանի ծննդյան 75-ամյակը:

Մ.Ա. Դավթյանը ծնվել է 1934 թ. հոկտեմբերի 14-ին Սոֆիայում (Բուլղարիա), 1946 թ. հայրենադարձվել է: 1952թ. ավարտելով միջնակարգ դպրոցն, ընդունվել է Երևանի պետական բժշկական ինստիտուտը, որն ավարտել է գերազանցությամբ 1958թ: 1958-1960թթ.՝ աշխատել է Թալինի շրջանում որպես տեղամասային բժիշկ, իսկ 1960-63թթ. սովորել ԽՍՀՄ ԲԳԱ կենսաբանական և բժշկական քիմիայի ինստիտուտի ասպիրանտուրայում՝ խոշոր կենսաքիմիկոսներ Ս. Կապլանսկու և Ա. Բրաունշտեյնի ղեկավարության ներքո: 1963թ. պաշտպանել է թեկնածուականատենախոսություն՝ նվիրված սրտամկանի ամինաթթվային փոխանակության հարցերին: Վերադառնալով Երևան՝ աշխատանքի է անցել ՀԽՍՀ ԳԱ կենսաքիմիայի ինստիտուտում, որտեղ 1970թ-ին պաշտպանել է դոկտորականատենախոսություն՝ գլխուղեղի օրնիտինային ցիկլի ֆերմենտների գործունեության վերաբերյալ:

Մ.Դավթյանը 1971թ. անցնում է աշխատանքի ԵՊՀ-ում և գրեթե 4 տասնամյակ իր գիտամանակավարժական գործունեությունն իրականացնում է մայր բուհում: Նա 1971-2000 թթ. և 2006 թվականից մինչև օրս ԵՊՀ կենսաքիմիայի ամբիոնի վարիչն է, միաժամանակ 1971թ-ից անընդմեջ համալսարանի կենսաքիմիայի պրոֆեսորն է (ներկայումս գիտահետազոտական) լաբորատորիայի ղեկավարն է: Մ.Դավթյանը 1978-85թթ. և 1996-99թթ. եղել է ԵՊՀ կենսաբանության ֆակուլտետի ղեկանը, 1985-89թթ.՝ համալսարանի ուսումնական աշխատանքների գծով պրոռեկտորը, իսկ 1990-91թթ.՝ առաջին պրոռեկտորը: Նա 1989-1990թթ. եղել է ՀՀ ժողովրդական կրթության նախարարը, իսկ 1999-2003թթ-ին՝ Խ.Աբովյանի անվան Հայկական պետական մանկավարժական համալսարանի ղեկավարը:

Մ.Դավթյանը լայն ճանաչում ունեցող կենսաքիմիկոս է: Նրա հետազոտությունները նվիրված են ազոտ պարունակող միացությունների, հատկապես ամինաթթուների

փոխանակության և համապատասխան ֆերմենտների ակտիվության կարգավորման հիմնահարցերին: Նա ապացուցել է կաթնասունների սրտամկանում ալանին դեհիդրոգենազի առկայությունը և պարզաբանել տրանսամինազների ներքջային տեղակայումը կարդիոցիտներում, հայտնաբերել L-ամինաթթվային օքսիդազը մի շարք օրգանիզմներում և հյուսվածքներում: Առանձնապես արժեքավոր են Մ.Դավթյանի և նրա աշխատակիցների կողմից օրնիտինային ցիկլի ֆերմենտների համեմատական էվոլյուցիոն առումով կատարված հետազոտությունները: Այդ հետազոտությունները թույլ տվեցին Մ.Դավթյանին հիմնավորել բնության մեջ մեծ տարածվածություն ունեցող ոչ ուրեոթելիկ արգինազի գոյությունը, որն ի տարբերություն ուրեոթելիկ օրգանիզմների լյարդում պարունակվող և ամոնիակի չեզոքացման նպատակով օրնիտինային ցիկլում գործող ուրեոթելիկ արգինազի, չի մասնակցում ամոնիակի չեզոքացման մեխանիզմներում և ունի ուրույն մետաբոլիկ դեր: Հիմնավորվեց ոչ ուրեոթելիկ արգինազի մասնակցությունը արգինինից պրոլինի առաջացման մեխանիզմում: Զգալի է Մ.Դավթյանի ներդրումը էվոլյուցիոն և անհատական զարգացման ընթացքում ուրեոթելիզմի ձևավորման մեխանիզմներում արտաքին պայմանների նշանակության, ուրեոթելիկ արգինազի ինդուկցման և արգինինի կենսասինթեզի հայտնի 4 ֆերմենտների հետ նրա ինտեգրացման վճռորոշ դերի մասին:

Ակադեմիկոս Մ.Դավթյանը մեծ կարևորություն է տալիս երիտասարդ մասնագետների պատրաստման գործին: Նա կարդացել է մի շարք նոր դասընթացներ (Նյութափոխանակության կարգավորում, Բժշկագիտության կենսաքիմիական ասպեկտները և այլն), որոնք շարունակ հարստացվում են գիտական վերջին տվյալներով: Նրա դասախոսությունները ունկնդրվում են մեծ հետաքրքրությամբ ինչպես ուսանողների, այնպես էլ դասախոսների և գիտաշխատողների կողմից: Նրա ղեկավարությամբ և խորհրդատվությամբ պաշտպանվել են շուրջ 70 թեկնածուական և 4 դոկտորական, այդ թվում արտասահմանյան քաղաքացիների, ատենախոսություններ: Մ.Դավթյանի սաներից շատերը ղեկավարում են տարբեր կենսաքիմիական լաբորատորիաներ հանրապետությունում կամ նրա սահմաններից դուրս: Մ.Դավթյանը հիրավի կենսաքիմիկոսների յուրահատուկ դպրոցի հիմնադիր է ու ղեկավար: ԵՊՀ կենսաքիմիայի ամբիոնը և նրա կից գործող գիտահետազոտական լաբորատորիան ամբողջովին համալրված են Մ.Դավթյանի աշակերտներով: Նրա նախաձեռնությամբ և ջանքերով 1974թ. ԵՊՀ-ում բացվել է կենսաքիմիական բաժանմունք, որի շրջանավարտներին շնորհվում է կենսաքիմիկոսի երազանքով (ԽՍՀՄ-ում նման բաժանմունք ունեցել են միայն Մոսկվայի և Կիևի համալսարանները):

Մ. Դավթյանի գիտահետազոտական աշխատանքների արդյունքներն ամփոփված են ավելի քան 300 գիտական հոդվածների, հեղինակային վկայականների և այլ հրատարակումների ձևով: Նա բազմիցս հանդես է եկել զեկուցումներով ու դասախոսություններով միջազգային գիտաժողովներում (Փարիզ, Օքսֆորդ, Լոս-Անջելես, Լյուբլին, Մոսկվա, Բրատիսլավա, Բուդապեշտ, Սանկտ(Պետերբուրգ, Տորոնտո), 1978թ.-ին Երևանում (ԵՊՀ) կազմակերպել համամիութենական գիտաժողով՝ նվիրված կյանքի ծագման և էվոլյուցիոն կենսաքիմիայի հարցերին, որին մասնակցել են գիտական տարբեր կենտրոններից ժամանած շուրջ 70 անվանի գիտնականներ: 1978թ.-ին նա ղեկավարել է ԽՍՀՄ գիտնականների պատվիրակությունը Կանադայում կայացած կենսաքիմիկոսների համաշխարհային գիտաժողովում, իսկ 1985թ. Մոսկվայում կենսաքիմիկոսների համամիութենական ընկերության կենտրոնական խորհրդի տարեկան նիստում կարդացել է նիստի ամփոփիչ զեկուցումը (նման ուշադրության արժանանում է տարեկան մեկ հեղինակ):

Մ.Դավթյանը 1977թ.-ին ԵՊՀ-ում կազմակերպել է գիտական աստիճաններ շնորհող մասնագիտական խորհուրդ, որի անընդմեջ նախագահն է մինչ օրս: Նա մի շարք գիտական կենտրոնների խորհուրդների, գիտական հանդեսների խմբագրական կոլեգիաների անդամ է: Մ.Դավթյանի գիտական էրուդիցիան, նվիրվածությունը գիտությանը, մարդկային բարյացակամությունը բերեցին նրան բարձր հեղինակություն, սեր և հարգանք:

Խոշոր գիտնականին ցանկանք երկար տարիների արդյունավետ գիտամանկավարժական գործունեություն:

Երևանի պետական համալսարան, կենսաբանության ֆակուլտետ: