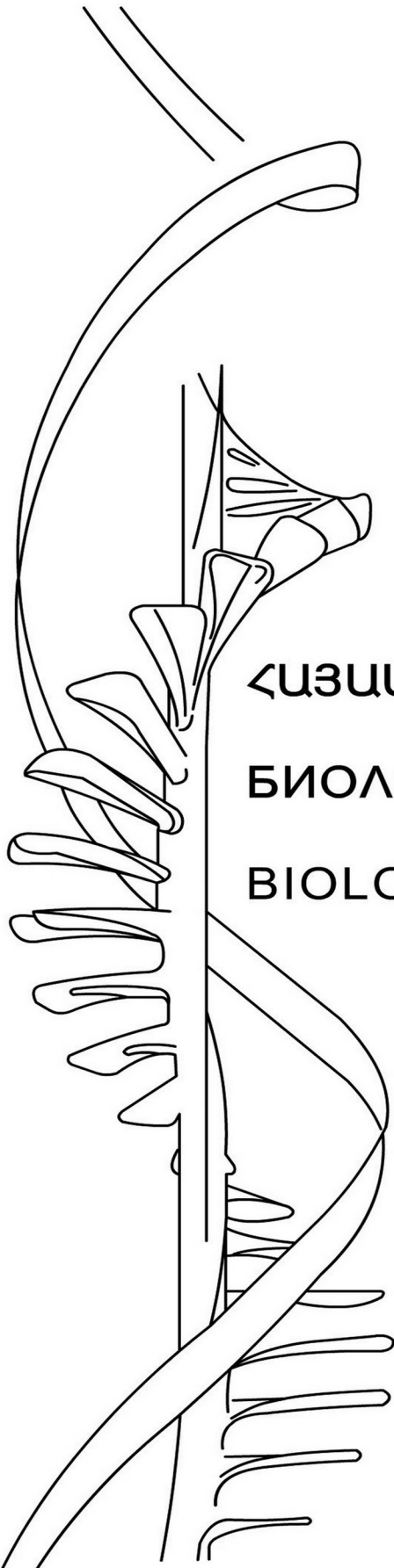


ISSN 0366-5119

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. Սոփոսյան.

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.

ԲՈՎԱՆԴԱԿՈՒԹՅՈՒՆ

Փորձարարական և տեսական հոդվածներ

Վարդևանյան Պ.Հ., Կարապետյան Ռ.Ա., Փարսադանյան Մ.Ա. Տարբեր ԳՑ-պարունակությամբ ԴՆԹ-ների հետ էթիդիումի բրոմիդի փոխազդեցության առանձնահատկությունները.....	6
Խաչատրյան Տ.Ս., Հարությունյան Է.Յու., Թովուզյան Վ.Օ., Կարապետյան Բ.Ռ., Ավագյան Ա.Է. Առնետների ողնուղեղի առանձին շարքանեյրոնների արտաբջջային էլեկտրական ակտիվության վրա խոլինի որոշ ածանցյալների ազդեցության համեմատական վերլուծությունը փորձարարական հիպոթիթեզի պայմաններում.....	12
Անտոնյան Ա.Պ., Ռյազանովա Ա.Ս., Վարդապետյան Հ.Ռ. ԴՆԹ-ի հետ պոդոֆիլոտոքսինի և էտոպոդիդի կոմպլեքսագոյացման հետազոտությունը կլանման սպեկտրոսկոպիայի մեթոդով.....	20
Ոսկանյան Ա.Վ., Անտոնյան Մ.Վ., Գևորգյան Ս.Ս. Լևանտինյան (<i>Macrovipera lebetina obtusa</i>) և Հայկական իծերի (<i>Montivipera raddei raddei</i>) թույների մահացու դրանների ազդեցության համեմատական հետազոտությունը.....	26
Հովսեփյան Ռ.Ա. Նոր տվյալներ Ապարան III վաղ բրոնզեդարյան բնակատեղիի բուսաբուծության վերաբերյալ (Հայաստան)	31
Մարգարյան Ա.Վ. Ինսուլինի ազդեցությունը ԴՆԹ-ի ինտերնուկլեոսոմային ֆրագմենտավորման և ՊԱՌՊ-1 ակտիվության վրա առնետների լյարդի և ուրցագեղձի բջջակորիզներում.....	38
Մելնիկովա-Շարովա Մ.Ա. ՊԱՌՊ-1-ի ակտիվության և քրոմատինի ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորման ինտենսիվության կախվածությունը ԱԵՖ-ից առնետների լյարդի բջջակորիզներում.....	44
Հարությունյան Ռ.Ա., Նահապետյան Խ.Հ., Բաբայանյան Ա.Ս., Հովհաննիսյան Լ.Է. Աղբենա-ընկալիչների դերը առնետների օրգանիզմի ջերմային հոմեոստազի կարգավորման գործում դիաբեթիտի ազդեցության պայմաններում.....	50
Պողոսյան Գ.Յու., Ջիվանյան Կ.Ա. Թռչունների թիմուսի մորֆոֆունկցիոնալ որոշ առանձնահատկությունների վերաբերյալ.....	54
Հովհաննիսյան Ն.Ա., Եսայան Ա.Հ. Հայաստանում <i>Aegilops Tauschii</i> պոպուլյացիաների գենետիկական բազմազանությունը.....	59
Գողարզինիկ Մ., Գրիգորյան Կ.Վ., Մովսեսյան Հ.Ս. Մնդիկի խտության որոշումը Բանդար Իմամի (Պարսից ծոց) ծովային նստվածքներում.....	66
Փանոսյան Հ.Հ. Հայաստանի երկրաջերմային աղբյուրներից մեկուսացված աերոբ թերմոֆիլ էնդոսպոր առաջացնող բակտերիաների ֆիլոգենետիկական բազմազանությունը՝ հիմնված 16S ռԲՆԹ գենի հաջորդականության վերլուծության վրա.....	73
Արծրունի Գ.Գ., Սահակյան Գ.Վ. Արտաքին էլեկտրաստատիկ դաշտի ազդեցությունը էրիթրոցիտների ստվերների վրա.....	81
Մաքրյան Ա.Գ., Ռեազյան Ռ.Հ., Արարատյան Լ.Ա., Սաֆրազբեկյան Է.Ա., Ավետիսյան Մ.Հ. Միջէկոհամակարգային կապերի յուրահատկությունները Արագածի լեռնային զանգվածում.....	86
Բաղդյան Վ.Լ. Հասապտղային կենու սերմերի ֆիզիկատեխնոլոգիական հատկությունները Հայաստանի տարբեր անտառային շրջաններում.....	94
Մարմարյան Գ.Յու., Գասպարյան Վ.Կ., Մովսիսյան Ա.Լ., Հարությունյան Ա.Ս., Քամալյան Ռ.Գ. Տարբեր գենոտիպի և սերունդների այծերի արյան սեզոնային որոշ կենսաքիմիական փոփոխություններ.....	97
Ռաֆիկ Աշոտի Հարությունյան (<i>ծննդյան 80-ամյակի առթիվ</i>)	100

СОДЕРЖАНИЕ

•Экспериментальные и теоретические статьи•

<i>Вардеванян П.О., Карапетян Р.А., Парсаданян М.А.</i> Особенности взаимодействия бромистого этидия с ДНК с различным GC-содержанием	6
<i>Хачатрян Т.С., Арутюнян Э.Ю., Топузян В.О., Карапетян И.Р. Авакян А.Э.</i> Сравнительный анализ действия некоторых производных холина на внеклеточную электрическую активность одиночных мотонейронов спинного мозга крыс в условиях экспериментального гипотиреоза.....	12
<i>Антонян А.П., Рязанова А.С., Вардапетян Р.Р.</i> Изучение комплексообразования подо- филлотоксина и этопозида с ДНК методом абсорбционной спектроскопии.....	20
<i>Восканян А.В., Антонян М.В., Геворгян С.С.</i> Сравнительное исследование токсического действия ядов левантийской (<i>Macrovipera lebetina obtusa</i>) и армянской (<i>Montivipera raddei raddei</i>) гадюк.....	26
<i>Овсепян Р.А.</i> Новые данные о растениеводстве раннебронзового поселения Апаран III (Армения)	31
<i>Маргарян А.В.</i> Действие инсулина на интернуклеосомальную фрагментацию ДНК и активность ПАРП-1 ядер тимоцитов и клеток печени крыс.....	38
<i>Мельникова-Шарова М.А.</i> Зависимость активности ПАРП-1 и интенсивности интернуклеосомального расщепления хроматина от концентрации АТФ в ядрах клеток печени крыс.....	44
<i>Арутюнян Р.А., Нагапетян Х.О., Бабаханян А.М., Оганесян Л.Э.</i> Роль адренорецепторов в регуляции температурного гомеостаза у крыс под воздействием диабета.....	50
<i>Погосян Г.Ю., Дживанян К.А.</i> О некоторых морфофункциональных особенностях тимуса птиц.....	54
<i>Ованесян Н.А., Есаян А.Г.</i> Генетическое разнообразие популяций <i>Aegilops tauschii</i> в Армении.....	59
<i>Годарзиник М., Григорян К.В., Мовсисян А.С.</i> Определение концентрации ртути в морских осадках Бандар имама (Персидский залив).....	66
<i>Паносян О.А.</i> Филогенетическое разнообразие аэробных термофильных эндоспорообразующих бактерий, изолированных из наземных геотермальных источников Армении, основанное на анализе последовательности гена 16 S рРНК.....	73
<i>Арицунни Г.Г., Саакян Г.В.</i> Влияние внешнего электростатического поля на титр эритроцитов.....	81
<i>Сакоян А.Г., Реваян Р.Г., Арапетян Л.А., Сафразбекян Э.А., Аветисян М.Г.</i> Особенности межэкосистемных связей в Арагацском горном массиве.....	86
<i>Бадалян В.Л.</i> Физико-технологические свойства семян тиса ягодного в различных лесных регионах Армении.....	94
<i>Мармарян Г.Ю., Гаспарян В.К., Мовсисян А.Л., Арутюнян А.М., Камалян Р. Г.</i> Некоторые сезонные биохимические изменения крови коз разных генотипов и поколений.....	97
<i>Рафик Ашотович Арутюнян (80-летие со дня рождения)</i>	100

CONTENTS

•Experimental and theoretical articles•

<i>Vardevanyan P.O., Karapetyan R.A., Parsadanyan M.A.</i> Peculiarities of interaction of ethidium bromide with different GC-content DNAs.....	6
<i>Khachatryan T.S., Harutyunyan E.Yu., Topuzyan V.O., Karapetyan I.R., Avagyan A.E.</i> Comparative analysis of the action of some choline derivates on extracellular electric activity of single motoneurons of rats spinal cord in experimental hypothyroidism conditions.....	12
<i>Antonyan A.P., Ryazanova A.S., Vardapetyan H.R.</i> Investigation of complex formation of podophyllotoxin and etoposide with DNA by the method of absorption spectroscopy....	20
<i>Voskanyan A.V., Antonyan M.V., Gevorgyan S.S.</i> Comparative study of lethal doses action of Levantine (<i>Macrovipera lebetina obtusa</i>) and Armenian (<i>Montivipera raddei raddei</i>) viper's venoms	26
<i>Hovsepyan R.A.</i> New data on agriculture of Aparan-III early bronze age settlement (Armenia).....	31
<i>Margaryan A.V.</i> Investigation of complex formation of podophyllotoxin and etoposide with DNA by the method of absorption spectroscopy.....	38
<i>Melnikova-Sharova M.A.</i> Dependence of PARP-1 activity and internucleosomal DNA fragmentation on ATP in isolated rat liver nuclei	44
<i>Harutyunyan R.A., Nahapetyan Kh.H., Babakhanyan A.M., Oganessian L.E.</i> The role of the adrenoreceptors in regulation of temperature homeostasis of the organism in rats under diabephite action.....	50
<i>Poghosyan G.Y., Jivanyan K.A.</i> Some morphofunctional features of bird's thymus.....	54
<i>Hovhannisyan N.A., Yesayan A.H.</i> Genetic diversity of <i>Aegilops Tauschii</i> populations in Armenia	59
<i>Godarznik M., Grigoryan K.V., Movsesyan H.S.</i> Determination of mercury concentration in Bandar Imam Marine sediments (Persian gulf)	66
<i>Panosyan H.H.</i> Phylogenetic diversity based on 16S rRNA gene sequence analysis of aerobic thermophilic endospore-forming bacteria isolated from geothermal springs in Armenia.....	73
<i>Artsruni G.G., Sahakyan G.V.</i> The influence of external electrostatic field on ghosts of erythrocytes.....	81
<i>Sakoyan A.G., Revazyan R.H., Araratyan L.A., Safrazbekyan E.A., Avetisyan M.H.</i> Peculiarities of inter-ecosystem bonds in the Aragats mountain region.....	86
<i>Badalyan V.L.</i> Physiological and technological specifications of common yew seeds growing in different forest regions of Armenia.....	94
<i>Marmaryan G. Yu, Gasparyan V. K., Movsisyan A.L., Harutyunyan A.M., Kamalyan R.G.</i> Some biochemical seasonal changes of goats blood of various genotypes and generation.....	97
<i>Rafik A. Harutyunyan (on 80-th anniversary)</i>	100



Biol. Journal of Armenia, 4 (62), 2010

PEQUILIARITIES OF INTERACTION OF ETHIDIUM BROMIDE WITH DIFFERENT GC-CONTENT DNAs

P.O. VARDEVANYAN, R.A. KARAPETYAN, M.A. PARSADANYAN

Yerevan State University, Department of Biophysics

In this work the formation of the ligand-DNA complexes by different modes using absorption and fluorescence spectroscopy methods has been investigated. Comparison of the obtained results has revealed the existence of two “strong” types of binding modes one of which shows fluorescent signal and therefore represents fully intercalated geometry. Second type of “strong” interaction has no fluorescent signal. The nonfluorescent binding corresponds to the ligand hemi-intercalative strong binding sites on DNA, where fluorescence of EtBr is quenched. Nonfluorescent complexes are formed in the minor groove of DNA with a significant affinity to GC-pairs.

*DNA – ethidium bromide (EtBr) - intercalation – hemi intercalation –
fluorescent complex – nonfluorescent complex*

Աշխատանքում կլանման և ֆլուորեսցենսային սպեկտրոսկոպիայի մեթոդներով հետազոտվել է ԴԵԲ-ի լիգանդ կոմպլեքսների տարբեր եղանակներով առաջացումը: Ստացված արդյունքների համեմատությունից բացահայտվել է, որ գոյություն ունի ,ուժեղե կապման եղանակի երկու տիպ, որոնցից մեկն ունի ֆլուորեսցենսային ազդակ և ինտերկալյացիոն երկրաչափություն: Ուժեղե փոխադրեցության երկրորդ տիպը չունի ֆլուորեսցենսային ազդակ: Չֆլուորեսցենցող կապումը համապատասխանում է ԴԵԲ-ի վրա լիգանդների կիսաինտերկալյացիոն եղանակով կապման տեղերին, որտեղ ԷԲ-ի ֆլուորեսցենցիան մարում է: Չֆլուորեսցենցող կոմպլեքսները առաջանում են ԴԵԲ-ի փոքր ակոսում և նշանակալից խնամակցություն ունեն GC -գույգերի նկատմամբ:

*ԴԵԲ — էթիդիումի բրոմիդ (ԷԲ) — ինտերկալյացիա — կիսաինտերկալյացիա —
ֆլուորեսցենցող կոմպլեքս — չֆլուորեսցենցող կոմպլեքս*

В данной работе исследовано образование ДНК-лиганд комплексов разными способами с помощью методов абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии. Сопоставление полученных результатов выявило существование двух типов «сильного» способа связывания, один из которых имеет флуоресцентный сигнал и представляет собой интеркаляционную геометрию. Второй тип «сильного» взаимодействия не имеет флуоресцентного сигнала. Нефлуоресцирующее связывание соответствует местам связывания лиганда на ДНК полуинтеркаляционным способом, где флуоресценция БЭ тушится. Нефлуоресцирующие комплексы образуются в малом желобке ДНК и обладают значительным родством к GC-парам.

*ДНК – бромистый этидий (БЭ) – интеркаляция – полуинтеркаляция –
флуоресцирующий комплекс – нефлуоресцирующий комплекс*

The binding parameters of the intercalator etidium bromide (EtBr) with different GC-content DNAs have been determined by absorption and fluorescence methods. The obtained experimental data provided a clear evidence of existence of fluorescent and nonfluorescent “strong” complexes at the low bound EtBr with DNA base pairs ratio ($r < 0.25$). The binding constant (K) and the number of base pairs corresponding to a binding site (binding site size, n) of the first (K_f and n_f) and second (K_{nf} , n_{nf}) interactions have been calculated. The total number of the binding site size $n \approx 1,5$ and $n_f \approx 2$ registered by absorption and fluorescent methods respectively have been independent of the GC-content whereas n_{nf} changed with variation of GC-portion for nonfluorescent mode of interaction. The fluorescent complex corresponds to intercalative model. The nonfluorescent complex is externally bound form of EtBr which exists at low occupancy ratios and is not the same as the electrostatically stabilized external bound with phosphate group one.

DNA is regulated and affected by many different types of molecules that interact with this biopolymer in various ways. Specifically, intercalative binding by small, planar, cationic aromatic molecules is one of several modes of such binding. The recent investigations showed that majority of intercalators might form more than one type of complexes with DNA (multimodal ligands). Ethidium bromide (EtBr) is one of the prominent representative of the multimodal ligands, which at small drug to DNA base pair ratio (r) values may form two types of “strong” complexes with DNA, one of which has been proposed to be in a stably bound external binding mode and another one is in the well described intercalation mode [2,7,11]. It has been shown that this external binding mode depended on the concentration of counter-ions (Na^+), concentration of the ligand and appeared more frequently in GC-regions of DNA. Existence of the significant affinity to the GC-regions led us to an assumption that different number of binding sites for this ligand on different GC-content DNA are detectable.

In this work absorption and fluorescence spectroscopy methods were employed to provide direct evidence of in formation of different modes of the ligand-DNA complexes. Comparison of the obtained results provided a clear evidence of existence of two “strong” types of binding modes one of which showed fluorescent signal and therefore represented fully intercalated geometry. Second type of “strong” interaction had no fluorescent signal providing the clue for external binding mode. It is suggested that the nonfluorescent strong complex is formed by hemi intercalation of in the minor groove of DNA. This complex is stabilized by hydrogen bonds between the ligand and nucleophilic centers of guanine which is exposed and accessible for the ligand in the minor groove.

Earlier we have shown that at low ligand concentrations EtBr may form two “strong” fluorescent and nonfluorescent complexes with B-form of DNA. The fluorescent complexes were referred to the “strong” one and corresponded to intercalation of this ligand which includes the insertion of the planar phenanthridium ring into the hydrophobic region of double stranded DNA (ds-DNA) base pairs [13]. The nonfluorescent binding corresponded to the ligand hemi intercalative strong binding sites on DNA, where fluorescence of EtBr was quenched. It has been suggested that nonfluorescent complexes formed in the minor groove of DNA with a significant affinity to GC-pairs.

It is revealed the relationship between the GC-content of DNA and binding modes of EtBr we determined the binding parameters of EtBr molecules using the absorption method detecting the total concentration of adsorbed on DNA molecules of the dye and the fluorescence method showing the amount of intercalated in the double helix molecules [6,10].

Materials and methods. Different GC-content DNAs (Cl. perf., 32%GC; calf thymus DNA(CT-DNA) 42%GC and M. lysod., 72%GC) and EtBr were purchased from Sigma Chemical Co. and used without further purification. Other chemicals used were of analytical grade. Solutions were prepared with double distilled water. Experiments were carried out as previously reported [11].

Hydrodynamic and fluoremetric experiments show that intercalation process is realized by hydrophilic transfer of EtBr from solvent to the binding site on ds-DNA. These models of interactions are accomplished exclusively at low ligand concentrations ($r < 0,25$) and referred to the "strong" mode of fluorescent and nonfluorescent complexes, therefore the experiments here were carried out at $0 \leq r \leq 0,25$.

Results and Discussion. The experimental results of investigation of effect of GC-content of DNA on EtBr binding process are represented on Fig. 1.

Parameter r vs. free dye concentrations (C_f) has been calculated using both the absorption method for total concentration of bound molecules (curve1) and fluoremetric method for intercalated EtBr molecules as r_f free ligand concentration C_f (curve 2). The binding curves obtained by two independent methods are different. The discrepancy between these curves can be explained by the presence of nonfluorescent EtBr molecules registered by the absorption technique. The binding curves for the nonfluorescent complex as r_{nf} vs. C_f (curve 3) were obtained by subtracting curve 2 from 1 at equal free dye concentrations C_f .

The binding parameters of EtBr fluorescent and nonfluorescent complexes have been obtained by Scatchard analysis of the absorption and fluorescence spectra (Table 1.).

Table 1. Thermodynamic parameters of the complexes of EtBr with different GC-content DNAs. Ionic strength $\mu = 20\text{mM Na}^+$; $\rho \text{ H6,9}$; $t = 25^\circ\text{C}$

The data of Table 1 show that the binding constants and stoichiometry of the complexes estimated by absorption method are practically independent of the GC-content and correlated with the data published in the literature [6,13]. The binding site of the fluorescent complexes $n \approx 2,2 \pm 0,1$ is also in accordance with experimental

DNA Metthod	Cl.perfinges		CT		M. lysod	
	$K \times 10^{-5}, M^{-1}$	n, b.p.	$K \times 10^{-5}, M^{-1}$	n, b.p.	$K \times 10^{-5}, M^{-1}$	n, b.p.
Absorption	$9,3 \pm 0,10$	10,0	$1,2,0 \pm 0,15$	9	$1,1 \pm 0,12$	10
Fluorescent	$8,9 \pm 0,10$	12,0	$1 \pm 0,15$	11	$1 \pm 0,12$	12
Nonfluorescent	$6,1 \pm 0,06$	5,0	$6,5 \pm 0,07$	5	$6,4 \pm 0,08$	5

data available in literature [1,3].

The binding parameters of the nonfluorescent complexes listed in Table 1 show that the binding constant K_{nf} for low and high GC-content DNAs are the same ($K_{nf} \approx 0,8 \cdot 10^5 M^{-1}$) whereas this parameter noticeable higher ($r = 1,2 \cdot 10^5 M^{-1}$) for CT DNA which may reflect the base pair distribution differences in CT DNA (blocks of this DNA can be considered having random base pair distribution) while the Cl.perf and M.lysod DNAs may consist of AT and GC clusters respectively, the structure of which will differ from that of DNA with random base pair distribution.

It is known that sequence specificity may be dominated by ability to select binding sites on the bases of groove width allowing optimum van der Waals' complimentary and hydrophobic surface burial, rather than specific hydrogen bonding interactions with the groove floor [4]. Therefore we registered weak affinity of EtBr for Cl.perf and M.lysod DNAs.

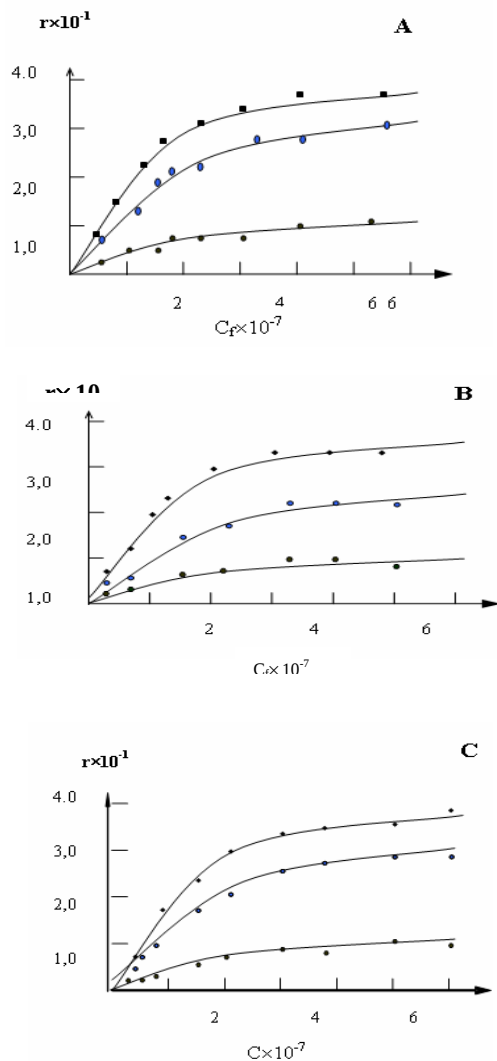


Fig. 1. Adsorption isotherms of EtBr on different GC-content DNAs based on the analyses of absorption (curves 1, r vs. C_f) and fluorescent (curves 2, r_n vs. C_f) spectra of the complexes. Curves 3 (r_n vs. C_f) were calculated for nonfluorescent complexes by subtraction of curves 2 from curves 1 at the same C_f values.

Cl.perfr.(A); CT (B); Mlys (C). $\mu=20\text{mMNa}^+$, $\rho\text{H } 6,9,4=25^\circ\text{C}$.

Hydrodynamic and fluoremetric experiments show that at low ligand concentrations intercalation process realized by hydrophobic transfer of EtBr from solvent to binding site where complex stabilized by non covalent molecular interactions (e.g. hydrogen bonds and van der Waals interactions) and is independent on ionic strength of solution [12]. On the contrary according to our experimental data nonfluorescent strong complexes are very sensitive to the environment ionic composition and completely abolished of high concentration of Na^+ (results are not presented).

The above-mentioned experimental data reveal two strong binding sites on DNA, where fluorescent and nonfluorescent complexes are formed. The nature of the fluorescent intercalation complex is well studied. EtBr intercalates in A and B forms of the helix.

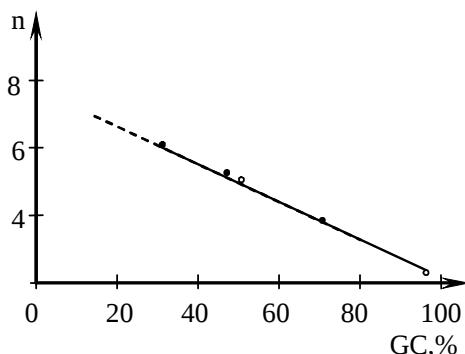


Fig. 2. Dependence of bindings site size (n) on GC-content of DNA. Dark circles for EtBr non-fluorescent complexes. Open circles data for nonintercalative complexes of EtBr from [1].

It is reasonable to suppose that the nonfluorescent strong complex is formed owing either to the EtBr partial (incomplete) intercalation in the double helix or in one on its grooves [7]. In the first and second models, the phenanthridine ring of EtBr molecule will be accessible for H_2O molecules to quench the dye fluorescence [5]. It is well known that EtBr intercalates in the double helix on the side of its minor groove [9], hence the supposition concerning the quenched complex formation in the groove seems justified. The existence of EtBr fluorescent and nonfluorescent strong complexes on DNA eliminates the contradictions arising upon the absorption and fluoremetric studies of the kinetics of its binding to DNA. The absorption technique registered two or three binding kinetics, whereas the fluoremetric one detected only a single kinetics.

REFERENCES

1. Borisova O.F., Scholkina A.A., Karapetyan A.T., Surovaya A.N. Heterogeneity of strong binding sites of ethidium bromide on DNA. Fluorescent and nonfluorescent complexes. (in russ.). *Mol. Biol.*, 32, p. 855-862, 1998.
2. Bresloff D.J., Crothers D.M. Equilibrium studies of ethidium-polynucleotide interactions. *J. Biochem.*, 20, 12, p. 3547-3553, 1981.
3. Borisova O.F., Golova Ju.B., Gottikh B.P., Zibrov A.S., Il'icheva I.A., Lysov Yu.P., Mamayeva O.K., Chernov B.P., Chernui A.A., Shchylolkina A.K., Florentiev V.L. Parallel double stranded helixes and the tertiary structure of nucleic acids. *J. Biomol. Struct and Dyn.*, 8, p. 1187-1210, 1991.
4. Chaires J.B. Energetics of drug-DNA interactions. *Biopolymers*, 44, p.201-215, 1998.
5. Lane A.N. Conformation of nucleic acids: problems and solutions. In *ACS Symposium Series 682, Molecular Modeling of Nucleic Acids* (eds. Leontis, N.B. & SantaLucia J.), p. 106-121, 1998.
6. Le-Pecq J.B., Paoletti C. A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids. Physical-chemical characterization. *J.Mol.Biol.*, 27, 1, p.87-106. 1967.

7. Monaco R.R. A Novel Major Groove Binding Site in B form DNA for Ethidium Cation. *J.Biomol.Struct.Dyn.*, 25, 2, p. 119-125, 2007.
8. Nikholaev V.A., Surovaia A.N., Sidorova N., Grokhovskii S.L., Zasedatelev A.S., Gurskii G.V., Zhuze A.L. Ligands with affinity to specific sequences of DNA base pairs. X. Synthesis and binding of netropsin analogues containing chelating copper ion oetide with DNA. *Mol. Biol. (russ.)*, 27, 1, p. 192-210, 1993.
9. Sobel H.M. Tsai C.-C., Jain S.C., Gillbert S.C. Visualization of drug-nucleic acid interactions at atomic resolution. III. Unifying structural concepts in understanding drug-DNA interactions and their broader implications in understanding protein-DNA interactions. *Mol. Biol.*, 114, p. 333-365, 1977.
10. Tischenko E.I. Karapetyan A.T., Borisova O.F. Heterogen complexes of ethidium bromide and their role in stabilization of (dA)_n-(dT)_n structures. (in russ.). *Mol. Biol.*, 30, 6, p. 1370-1377, 1996.
11. Vardevanyan P. O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Davtyan H.G., Karapetyan A.T. The binding of ethidium bromide with DNA: Interaction with single- and double-stranded structures. *Experimental and Molecular Medicine*. 35, 6, p. 527-533, 2003.
12. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Davtyan H.G., Boyajyan Z.R., Karapetian A.T. Complex-Formation of Ethidium Bromide with Poly[d(A-T)]-Poly[d(A-T)]. *J. Biomol. Struct. And Dyn.*, 22, 4, p. 465-470, 2005.
13. Waring M.J. Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *J. Mol. Biol.*, 13, 2, p. 269-282, 1965.
14. Wartell R.M., Benight. Thermal denaturation of DNA molecules. A comparison theory with experiment. *Physics reports*. 126, 2, p. 67-107, 1985.

Received 28.10.2010



Биол. журн. Армении, 4 (62), 2010

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ДЕЙСТВИЯ НЕКОТОРЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ХОЛИНА НА ВНЕКЛЕТОЧНУЮ ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ОДИНОЧНЫХ МОТОНЕЙРОНОВ СПИННОГО МОЗГА КРЫС В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ГИПОТИРЕОЗА

Т. С. ХАЧАТРЯН, Э. Ю. АРУТЮНЯН, В. О. ТОПУЗЯН,
И. Р. КАРАПЕТЯН, А. Э. АВАКЯН

*Институт тонкой органической химии им. А. Л. Мнджояна НАН РА,
Ереванский базовый медицинский колледж № 1, ООО «ТИАР», Ереван*

Обсуждается вопрос применения 3 синтетических производных холина – йодметилата 2 – (диметиламино) этилового эфира N – (п – метоксибензоил) – DL – фенилаланина, йодметилата 2 – (диметиламино) этилового эфира N – бензоил – DL – валина и йодметилата 2 – (диметиламино) этилового амида N – (п – метоксибензоил) – DL – фенилаланина у крыс в условиях экспериментально вызванной патологии щитовидной железы – гипотиреозе. Полученные результаты свидетельствуют о положительном эффекте данного комплекса соединений на внеклеточную фоновую и вызванную электрическую активность одиночных мотонейронов спинного мозга крыс в условиях гипотиреоза. Регистрация и анализ электрофизиологических показателей спинного мозга крыс проводилась посредством специальных программ в режиме *on-line*.

*Мотонейроны – фоновая активность – вызванная активность –
гипотиреоз – холиновые производные*

Ուսումնասիրվել է 3 խմիկի սինթետիկ ածանցյալների-յոդմեթիլատ 2—(դիմեթիլամին) էթիլ էթերի N—(պ—մեթօքսիբենզոիլ)—DL—ֆենիլալանինի, յոդմեթիլատ 2—(դիմեթիլամին) էթիլ էթերի N—բենզոիլ—DL—վալինի և յոդմեթիլատ 2—(դիմեթիլամին) էթիլ ամիդի N—(պ—մեթօքսիբենզոիլ)—DL—ֆենիլալանինի ազդեցությունը առնետների վահանաձեղձի փորձարարական եղանակով հարուցված վնասվածքի՝ հիպոթիրեոզի ժամանակ: Ստացված տվյալները վկայում են, որ քիմիական միացությունների տվյալ համակարգը դրական ազդեցություն ունի ողնուղեղի առանձին շարժանեյրոնների էլակետային $\square$ հարուցված արտաբջջային էլեկտրական ակտիվության վրա փորձնական հիպոթիրեոզի պայմաններում: Ողնուղեղի էլեկտրաֆիզիոլոգիական ցուցանիշների գրանցումը և վերլուծությունը կատարվել են հատուկ ծրագրերով՝ *on-line* ռեժիմում:

Շարժանեյրոններ (էլակետային ակտիվություն (հարուցված ակտիվություն (հիպոթիրեոզ (խմիկի ածանցյալներ

In these series of investigations the action of 3 choline synthetic derivatives – iod – methylate 2 – (dimethylamino) ethyl – N – (p – metoxybenzoil) – DL – fenilalanyn ether, iod – methylate 2 – (dimethylamino) ethyl – N – benzoil – DL – valin ether and iod – methylate 2 – (dimethylamino) ethyl – N – (p – metoxybenzoil) – DL – fenilalanyn amid on rats with experimental hypothyroidism is discussed.

The obtained results show the positive effect of these substances on extracellular background and evoked electric activity of rat's spinal cord single motoneurons in condition of hypothyroidism. The recording and analysis of the electrophysiological factors of rats spinal cord was done by means of special software in on-line mode.

*Motoneurons – background activity – evoked activity –hypothyroidism –
choline derivatives*

Болезни щитовидной железы (ЩЖ) являются одной из самых распространённых форм патологии человека. В последние годы во многих регионах Армении отмечен значительный рост частоты тиреоидных заболеваний, что связано с ухудшением экологической обстановки, недостаточным поступлением в организм йода, негативными сдвигами в питании населения, возрастанием частоты аутоиммунных болезней.

В структуре патологий ЩЖ по частоте и социальной значимости одно из ведущих мест занимает гипотиреоз (ГПТ). ГПТ – клинический синдром, вызванный длительным, стойким недостатком гормонов ЩЖ в организме, сопровождающимся снижением их биологического эффекта на тканевом уровне. Общеизвестно, что ГПТ (микседема) может быть как врождённым, так и приобретённым в результате поражения ЩЖ различными патологическими процессами. Длительное и стойкое гипотиреоидное состояние организма может привести к микседеме. Причины, вызывающие ГПТ и микседему, весьма разнообразны. Это заболевание может возникнуть в результате длительно протекающих тиреоидитов или струмитов, наличия опухолевого процесса в ЩЖ, а также в послеоперационном периоде на почве тотально произведённой тиреоидэктомии. Причинами развития ГПТ и микседемы может быть передозировка радиоактивного йода или избыточная лучевая терапия, а также нарушение регуляторных влияний на ЩЖ со стороны гипоталамо-гипофизарной области головного мозга. В ЩЖ при различных формах ГПТ и микседемы, кроме выраженных склеротических и атрофических изменений, может нередко сохраняться фолликулярное строение тиреоидной паренхимы с очень низким уплощённым эпителием; в этих случаях конфигурация фолликулов преимущественно неправильная, размеры их значительно уменьшены. Интерфолликулярные островки встречаются редко и образованы они преимущественно мелкими атрофичными клетками тиреоидного эпителия. ЩЖ при ГПТ и микседеме чаще уменьшена, эластической, иногда плотноватой консистенции, бурого, серого или розового цвета. При стойких, запущенных формах микседемы в ЩЖ нередко можно обнаружить гнойные воспалительные очаги (струмиты), инфекционные специфические гранулемы сифилитической, туберкулёзной или актиномикотической природы, новообразования различного характера и хронические неспецифические тиреоидиты, приводящие к разрушению тиреоидной паренхимы и значительному снижению, а иногда и полному прекращению её функциональной деятельности (атиреозу) [1, 10, 12, 17–19, 21]. По данным большинства исследователей, распространённость заболевания среди населения составляет 0,5-1%, а с учетом субклинических форм может достигать 10%. Патогенетически ГПТ подразделяется на первичный (тиреогенный); вторичный (гипофизарный); третичный (гипоталамический); тканевой (транспортный, периферический). Вторичные и третичные формы ГПТ (так называемый центральный ГПТ) связаны с поражением гипоталамо-гипофизарной системы при таких заболеваниях, как аденомы гипофиза, инфаркты и некрозы гипофиза (развитие их возможно при ДВС-синдроме и массивных кровотечениях) и др. Этиологическими факторами также могут быть воспалительные заболевания головного мозга (менингиты, энцефалиты и др.), хирург-

гические и лучевые воздействия на гипофиз. Снижение функциональной активности ЩЖ при центральных формах ГПТ связано с дефицитом тиреотропного гормона (ТТГ). Дефицит ТТГ при этом может быть изолированным, однако чаще он сочетается с нарушением секреции других тропных гормонов гипофиза (в таких случаях говорят о гипопитуитаризме). Помимо приобретённых форм гипотиреоза, существуют врождённые формы заболевания. Частота врождённого гипотиреоза в Армении составляет в среднем 1 случай на 4000 новорожденных. Причинами врожденного ГПТ могут быть аплазия и дисплазия ЩЖ, генетически обусловленные дефекты биосинтеза тиреоидных гормонов, тяжёлая йодная недостаточность, аутоиммунные заболевания ЩЖ у матери (из-за проникновения тиреоблокирующих антител через плаценту), лечение тиреотоксикоза у матери тиреостатическими препаратами или радиоактивным йодом. К числу редких причин следует отнести врождённый дефицит ТТГ, а также синдром периферической резистентности к тиреоидным гормонам. В корригировании вышеотмеченных нарушений особого внимания заслуживает применение холиновых эфиров и амидов аминокислот и пептидов, заслуживающих существенного внимания с точки зрения особенностей их синтеза и биологической активности, играющих важную роль, благодаря их сходству по химической структуре с нейротрансмиттером ацетилхолином, в системе нейроэндокринной регуляции клетки [4, 5]. Согласно результатам исследований последних лет [22, 23], холиновыми эфирами осуществляется ряд важнейших функций в растениях, а также в организме человека и животных. Вместе с тем, продолжают отсутствовать сведения относительно применения эфиров холина при ГПТ и результатов их действия на мотонейроны (МН) спинного мозга (СМ) у млекопитающих. Исходя из поиска оптимальных средств, стимулирующих и благоприятствующих лечению этих весьма сложных и распространённых патологий организма человека и животных и с учётом вышеотмеченных особенностей холиновых эфиров и амидов, нами синтезированы три производные холина–йодметилат 2–(диметиламино) этилового эфира N–(п–метоксибензоил)–DL–фенилаланина (ДЭФ), йодметилат 2–(диметиламино) этилового эфира N–бензоил–DL–валина (ДЭВ) и йодметилат 2–(диметиламино) этилового амида N–(п– метоксибензоил)–DL–фенилаланина (ДАФ) и проведено электрофизиологическое исследование их действия на МН СМ у гипотиреоидных крыс.

Материал и методика. Эксперименты были поставлены на 55 крысах – самцах, массой 200 – 220 г, разделённых на следующие подопытные группы: первая – интактные животные – 5 экз.; вторая – животные с экспериментальным ГПТ, вызванным тиреоидэктомией, – 10 экз.; третья – животные с экспериментальным ГПТ, получавшие внутримышечные инъекции ДЭФ в дозе 200 мкг/кг массы тела – 10 экз.; четвёртая – животные с экспериментальным ГПТ, получавшие внутримышечные инъекции ДЭВ в дозе 200 мкг/кг массы тела – 10 экз.; пятая – животные с экспериментальным ГПТ, получавшие внутримышечные инъекции ДАФ в дозе 200 мкг/кг массы тела – 10 экз.; шестая – животные с экспериментальным ГПТ, получавшие сочетанные внутримышечные инъекции ДЭФ, ДЭВ и ДАФ в дозе 70 мкг/кг массы тела каждого соединения – 10 экз.. Исследуемые соединения вводились подопытным животным в течение 1 месяца. Дозировка этих соединений была избрана с учётом интенсивности данной патологии ЩЖ и токсических свойств этих препаратов. Тиреоидэктомия у 50 крыс осуществлялась по следующему алгоритму. Для проведения операции крысы под эфирным наркозом фиксировались в положении на спине. Доступ к ЩЖ осуществлялся через разрез кожи в области шеи длиной около 3,5–4 см. Затем обнажали ЩЖ, производили отпрепаровку 2/3 её части с сохранением парашитовидных желёз и с помощью острых ножниц доли отсекали, после чего под каждую из них подводились лигатуры. Раны послойно зашивались. Животные хорошо переносили операцию и спустя 0,5–1 ч после операции подходили к корму и воде. За каждым животным в период дачи препаратов велось индивидуальное наблюдение с каждодневной регистрацией клинических показателей. Последующие электрофизиологические исследования биоэлектричес-

ких показателей СМ проводились в остром эксперименте. Под эфирным наркозом крысу обезд-
виживали дитилином и переводили на искусственное дыхание; СМ пересекался под новокаином
ультразвуковым ножом на уровне Т2–Т3. После прочной фиксации пояснично – крестцового от-
дела позвоночника в стереотаксическом приборе производили ламинэктомию данной области.
Электрофизиологическими методами изучалась внеклеточная фоновая (ФА) и вызванная (ВА)
электрическая активность одиночных МН СМ у интактных и гипотиреоидных животных. Регис-
трацию и анализ внеклеточной ФА и ВА одиночных МН СМ производили с помощью специа-
льных программ на компьютере. При записи ВА одиночных МН СМ проводилась оценка стаци-
онарности престаимпульной и постстимульной активности нейрона после электрического раздра-
жения седалищного нерва. Выборка спайков проводилась с помощью амплитудного дискрими-
натора посредством программного анализа. Вычислялась скользящая частота (для каждых 10
межимпульсных интервалов с шагом 5 интервалов), сериальные гистограммы до 50 порядка,
гистограммы межимпульсных интервалов, на основе которых вычислялась средняя частота
фоновой нейрональной потока одиночных клеток, а также спайковая выборка нескольких (до
20) повторений до и после раздражения. Последующий анализ ФА и ВА одиночных МН СМ
крыс осуществляли по алгоритму, подробно описанному в наших предыдущих статьях [2, 3, 6–9].

Результаты и обсуждение. На рис. 1 приведены примеры кумулятивных (рис. 1, пункты 1–3, а, б) и суммированных (рис. 1, пункты I–III, в) преста-
импульсных и постстимульных гистограмм внеклеточной ФА и ВА одиночного МН
СМ у интактных животных (глубина 1400 мк; пункт I, а, б, в); у гипотиреоидных
животных (глубина 1400 мк, пункт II, а, б, в) и у гипотиреоидных животных,
получавших ДЭФ (глубина 1400 мк, пункт III, а, б, в). Согласно данным пункта II,
(а, кривые 1, 2) в картине внеклеточной ФА и ВА одиночного МН СМ наблю-
дается трансформация регулярного типа разряда ФА одиночного МН в пачечную
«патологическую» активность (рис. 1, пункт 2, а, кривая 1) с почти полным исчез-
новением вызванного синаптического ответа (рис. 1, пункт II, а, кривая 2), кото-
рое, вероятно, можно объяснить патологическим влиянием ГПТ. Анализируя вы-
шеизложенное, можно сделать вывод о том, что при ГПТ происходит резкое уре-
жение ФА и ВА одиночного МН СМ, по сравнению с аналогичной картиной
данных электрофизиологических показателей у интактных животных (рис. 1,
пункт I, а, кривые 1, 2), что можно объяснить, по-видимому, недостатком кальция,
весьма характерным для данной патологии ЩЖ млекопитающих.

После введения ДЭФ наблюдается эффект нормализации пачечной ак-
тивности одиночного МН СМ с переходом в «нормальный» регулярный разряд
МН с сохранением и увеличением вызванного синаптического ответа (рис. 1,
пункт III, а, кривые 1, 2), что говорит об усилении действия ДЭФ. Что же касается
импульсного потока (рис. 1, пункт III, б), то здесь после введения ДЭФ (доза 200
мкг/кг массы тела), он представлен регулярным видом фоновой нейрональной
разряда МН. Аналогичные сдвиги вызванного ответа при ГПТ в 2–3 раза отраже-
ны и на суммарных гистограммах (рис. 1, пункт II, в), а при действии ДЭФ – на
суммарных гистограммах (рис. 1, пункт III, в). Анализируя данный рисунок,
можно сделать вывод об активирующем протекторном действии ДЭФ на внекле-
точную ФА и ВА одиночных МН СМ крыс при экспериментальной дисфункции
ЩЖ – ГПТ.

На рис. 2 приведены примеры кумулятивных (2, пункты I–III, а, б) и сум-
мированных (пункты I–III, в) престаимпульсных и постстимульных гистограмм внек-
леточной ФА и ВА одиночного МН у гипотиреоидных животных, получавших
ДЭВ (глубина 1400 мк; пункт I, а, б, в); у гипотиреоидных животных, получавших
ДАФ (глубина 1400 мк; пункт II, а, б, в); у гипотиреоидных животных,
получавших сочетанный комплекс ДЭФ, ДЭВ и ДАФ (глубина 1400 мк; пункт III,
а, б, в). После введения ДЭВ в дозе, аналогичной ДЭФ (рис. 2, пункт I, а, кривые 1,
2) наблюдается частичная трансформация пачечного типа ФА и ВА одиночного

МН СМ в регулярный тип разряда; в картине импульсного потока (рис. 2, пункт I, б) также продемонстрирован регулярный вид фонового разряда МН, но по сравнению с картиной импульсного потока, полученной при применении ДЭФ (рис. 1, пункт III, б), восстановление фонового нейронального разряда одиночного МН СМ выражено гораздо слабее, что позволяет заключить о более слабо выраженном действии ДЭВ на фоновую ритмику одиночных МН СМ крыс по сравнению с ДЭФ. На суммарных гистограммах (рис. 2, пункт I, в) при применении ДЭВ отражены сдвиги вызванного ответа одиночного МН СМ в 1–2 раза, что лишний раз подтверждает более слабое протекторное действие ДЭВ по сравнению с ДЭФ.

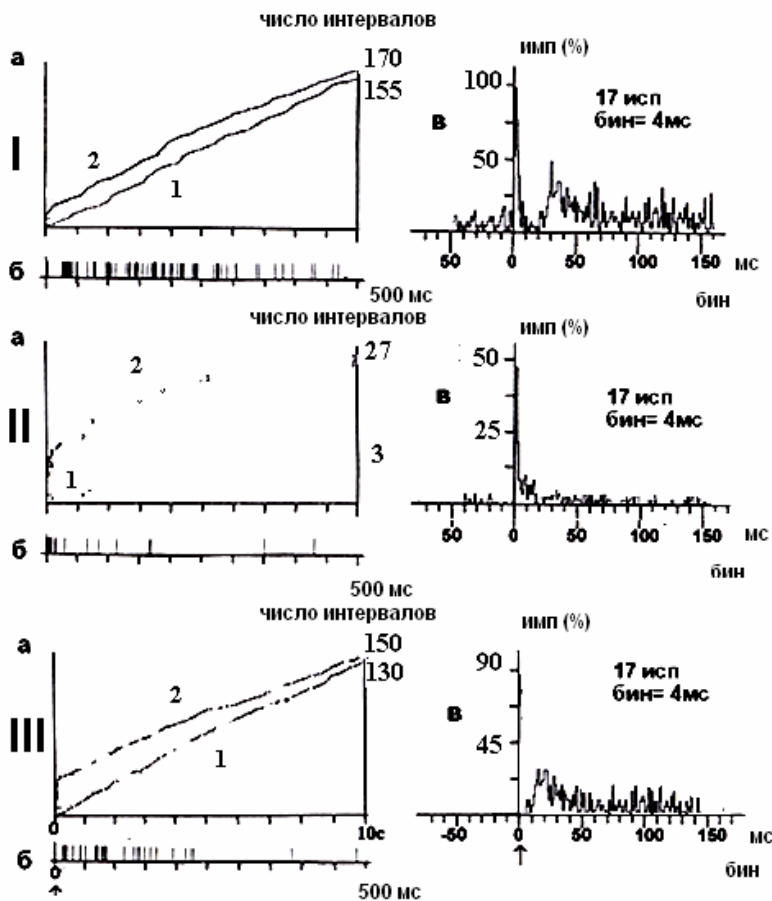


Рис. 1. Кумулятивные (а) и суммированные (в) пре (1) – и постстимульные (2) гистограммы фоновой и вызванной активности одиночного мотонейрона (глубина 1400 мк) вентрального рога спинного мозга крыс в норме (пункт I а, б, в); одиночного мотонейрона (глубина 1400 мк) вентрального рога спинного мозга крыс при гипотиреозе (пункт 2 а, б, в) и одиночного мотонейрона (глубина 1400 мк) вентрального рога спинного мозга у гипотиреоидных крыс, получавших в течение 1 месяца ДЭФ (пункт 3 а, б, в). На «а»: ордината – число импульсов до и после стимуляции нерва, абсцисса – время регистрации импульсного потока. На «б»: картина импульсного потока после стимуляции нерва в избранном интервале времени. На «в»: ордината – процент импульсов (в бинах) от числа проб, абсцисса – последовательность бинов.

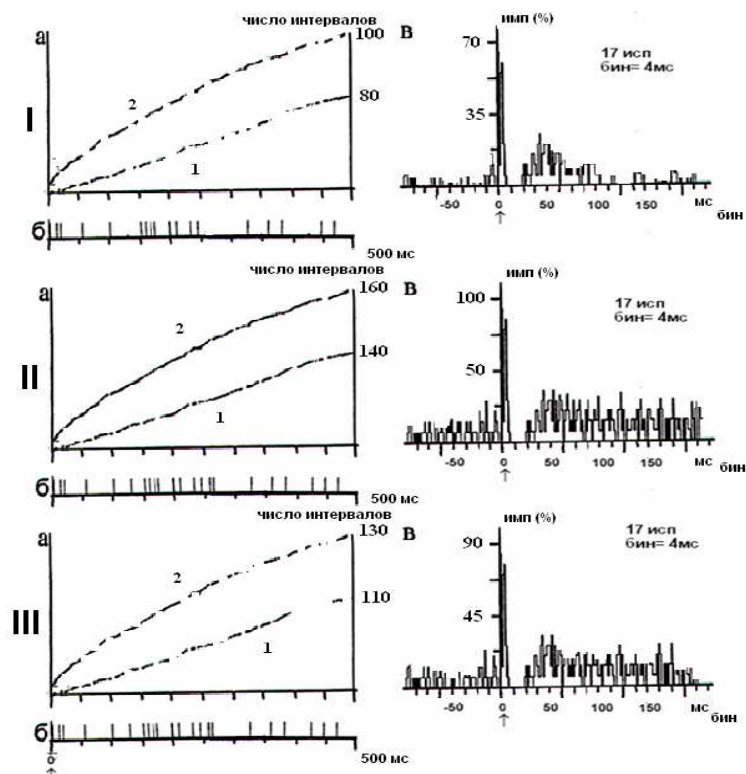


Рис. 2. Кумулятивные (а) и суммированные (в) пре (1) – и постстимульные (2) гистограммы фоновой и вызванной активности одиночного мотонейрона (глубина 1400 мк) вентрального рога спинного мозга гипотиреоидных крыс, получавших в течение 1 месяца ДЭВ (пункт 1 а, б, в); одиночного мотонейрона (глубина 1400 мк) вентрального рога спинного мозга гипотиреоидных крыс, получавших в течение 1 месяца ДАФ (пункт 2 а, б, в) и одиночного мотонейрона (глубина 1400 мк) вентрального рога спинного мозга у гипотиреоидных крыс, получавших в течение 1 месяца сочетанный комплекс ДЭФ, ДЭВ и ДАФ (пункт 3 а, б, в). На «а»: ордината – число импульсов до и после стимуляции нерва, абсцисса – время регистрации импульсного потока. На «б»: картина импульсного потока после стимуляции нерва в избранном интервале времени. На «в»: ордината – процент импульсов (в бинах) от числа проб, абсцисса – последовательность бинов.

После введения ДАФ в дозе, аналогичной ДЭФ и ДЭВ (рис. 2, пункт II, а, кривые 1,2), наблюдается более усиленный эффект трансформации пачечного типа ФА и ВА одиночного МН СМ по сравнению с ДЭФ и ДЭВ; в картине импульсного потока (рис. 2, пункт II, б) показан эффект восстановления практически до нормы фоновой нейрональной разряды с переходом его в регулярный тип ответа МН. На суммарных гистограммах при применении ДАФ представлено резкое усиление вызванного ответа одиночного МН СМ в 5–6 раз (рис. 2, пункт II, в), что свидетельствует о более сильном, активирующем действии ДАФ на вызванную ритмику одиночных МН СМ по сравнению с ДЭФ и ДЭВ, что, вероятно, свидетельствует о более сильном протекторном действии на электрофизиологические показатели СМ крыс амидов холина по сравнению с эфирами холина, вследствие химической структуры данных соединений и особенностей их синтеза.

В отдельной серии исследований с целью установления особенностей влияния комплекса амидов и эфиров холина (ДЭФ, ДЭВ и ДАФ) у гипотиреоидных крыс были зарегистрированы показатели ФА и ВА одиночных МН СМ (глубина 1400 мк; рис. 2, пункт III, а, кривые 1, 2). Полученные данные свидетельствуют о том, что в данном случае наблюдается более усиленный эффект трансформации ФА и ВА одиночного МН из пачечного типа разряда в регулярный тип, по сравнению с ДЭФ, и в особенности с ДЭВ, но не превосходящий по своим показателям ДАФ. Что касается импульсного потока (рис. 2, пункт III, б), то здесь, после введения вышеотмеченного комплекса препаратов, он также представлен регулярным видом фонового разряда МН, что, несомненно, свидетельствует о положительном влиянии данного комплекса при экспериментальном ГПТ. У гипотиреоидных крыс при применении сочетанного комплекса ДЭФ, ДЭВ и ДАФ происходят также вышеупомянутые сдвиги вызванного ответа МН в 3–4 раза, что превосходит ДЭФ и ДЭВ, но не достигает ДАФ. Это отражено на суммарных гистограммах (рис. 2, пункт III, в).

Также в наших исследованиях были изучены более высокие дозы ДЭФ, ДЭВ и ДАФ (300, 500, 700 мкг/кг массы тела) как в отдельности, так и в разных их сочетаниях; однако выяснилось, что эти дозы оказывают патологическое влияние и на клиническое состояние у подопытных животных: происходит изменение шерстного покрова, пигментации кожи, потеря ориентации и зрения, вызванные, вероятно, высокой степенью токсичности использованных доз и электрофизиологических показателей ФА и ВА одиночных МН СМ, заключающихся в проявлении «пачек», что свидетельствует об оптимальной дозе ДЭФ, ДЭВ или ДАФ при ГПТ, составляющей 200 мкг/кг массы тела. Применение сочетаний данных препаратов в дальнейших исследованиях мы считаем нецелесообразным, так как при применении ДАФ зарегистрирован более выраженный эффект трансформации пачечного «патологического» нейронального типа разряда в «нормальный» регулярный тип разряда МН. Этот феномен, вероятно, обусловлен особенностью химической структуры амидов холина и свободным их проникновением через гематоэнцефалический барьер. Изучение эффектов более низких доз этих соединений станет предметом наших последующих исследований.

В результате проведенного анализа полученных данных мы пришли к выводу, что в целом имеется положительный эффект от применения холиновых производных при ГПТ. Итак, результаты ранее проведенных исследований действия холиновых производных [11, 13–16, 20, 24], а также результаты серии исследований показали эффективность действия производных холина, в особенности ДАФ, на внеклеточную ФА и ВА одиночных МН СМ крыс при экспериментально вызванном ГПТ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бреславский А.С., Гордиенко В.М. Патологическая анатомия желёз внутренней секреции. Изд. «Здоров'я», Киев, с. 34–35, 1974.
2. Киприян Т.К., Хачатрян Т.С. Протекция гипоталамическим нейрогоном острой нейродегенерации мотонейронов спинного мозга, вызванной змеиными ядами. Информационные технологии и управление, № 5, с. 68–75, 2007.
3. Матинян Л.А., Хачатрян Т.С., Киприян Т.К., Арутюнян Э.Ю., Авакян А.Э. Влияние трипсина, химотрипсина, лидазы на вызванную активность повреждённых травмой одиночных мотонейронов спинного мозга крыс. Вестник МАНЭБ, 13, 4, вып. 1., с. 117–120, 2008.
4. Мнджоян О.Л., Топузьян В.О. Методы синтеза и свойства β -диметиламиноэтиловых и холиновых эфиров аминокислот и пептидов. Успехи химии., L (12): 2198–2211, 1981.

5. Качук В.А. Молекулярные механизмы нейроэндокринной регуляции. Соросовский образовательный журнал, 6, с. 25–31, 1998.
6. Хачатрян Т.С. Действие лидазы и тироксина на фоновую электрическую активность одиночных пирамидных нейронов коры больших полушарий крыс. Биолог. журн. Армении, 59, 3–4, с. 198–202, 2007.
7. Хачатрян Т.С. Протекция тироксином изменений вызванной активности повреждённых травмой одиночных мотонейронов спинного мозга крыс. Биолог. журн. Армении, LX, 3, с. 64–67, 2008.
8. Хачатрян Т.С., Киприян Т.К. Изменение суммарной и одиночной электрической активности интернейронов и мотонейронов спинного мозга крыс при гипотиреозе и гипертиреозе. Информационные технологии и управление, 4–3, с. 46–51, 2006.
9. Хачатрян Т.С., Нагапетян Х.О., Матинян Л.А. Фитотерапия в сочетании с тироксином при органических повреждениях спинного мозга. Биолог. журн. Армении, LX, 4, с. 51–55, 2008.
10. Abdullatif H.D., Ashraf A. Reversible subclinical hypothyroidism in the presence of adrenal insufficiency. Endocr. Pract., 5, 12, p. 572, 2006.
11. Brown M., Davies I.M., Moffat C.F., Redshaw J., Craft J.A. Characterisation of choline esterases and their tissue and subcellular distribution in mussel (*Mytilus edulis*). Mar. Environ. Res., 3, 57, pp. 155–169, 2004.
12. Ciesielska-Kopacz N., Kos-Kudla B., Pluskiewicz W. The influence of thyroid diseases and their treatment on the development of osteoporosis. J. przegl. Lek., 5, 55, pp. 271–273, 1998.
13. Di Venosa G., Hermida L., Battle A., Fukuda H., Defain M. V., Mamone L., Rodriguez L., MacRobert A., Casas A. Characterisation of liposomes containing aminolevulinic acid and derived esters. Photochem. Photobiol., 1, 92, pp. 1–9, 2008.
14. 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. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 48, 3, pp. 1305–1311, 2007.
15. Grigoryan H.A., Hambarzumyan A.A., Mkrtchyan M.V., Topuzyan V.O., Halebyan G.P., Asatryan R.S. Alpha,beta-Dehydrophenylalanine choline esters, a new class of reversible inhibitors of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. Chem. Biol. Interact., 171, 1, pp. 108–116, 2008.
16. 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. Am. J. Clin. Nutr., 4, 64, pp. 572–576, 1996.
17. Jonderko G., Straszecka J., Marcisz C., Wieczorek U. Influence of treating hypothyroidism and hyperthyroidism upon physical reaction time. Pol. Arch. Med., 5, 88, pp. 295–301, 1992.
18. Jorde R. “Subclinical” thyroid disease. J. Tidsskr. Nor. Lageforen., 9, 122, pp. 938–940, 2002.
19. Larsen P.R. Ontogenesis of thyroid function, thyroid hormone and brain development, diagnosis and treatment of congenital hypothyroidism. In: DeGroot L.J., Larsen P.R., Henneman G., eds. The thyroid and its diseases 6th ed. New-York: Churchill Livingstone, 1996, pp. 541 – 567.
20. Masson P., Froment M.T., Gillon E., Nachon F., Lockridge O., Schopfer L.M. Hydrolysis of oxo- and thio-esters by human butyrylcholinesterase. Biochim. Biophys. Acta1774, 1, pp. 16–34, 2007.
21. Nerush P.O., Demchenko O.M. Effect of hypothyroidism on glial fibrillary acid protein in the structures of the rat brain. Fiziol. Zh., 6, 52, pp. 45–51, 2006.
22. Terkeltaub R. Physiologic and pathologic functions of the NPP nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family focusing on NPP1 in calcification. Purinergic Signal., 2, 2, pp. 371–377, 2006.
23. Walz I., Schwack W. Multienzyme inhibition assay for residue analysis of insecticidal organophosphates and carbamates. Argic. Food. Chem., 26, 55, pp. 10563–10571, 2007.
24. Zeisel S. H. Choline: Needed for Normal Development of Memory. Am. J. Clin. Nutr., 19, 905, pp. 528–531, 2000.

Поступила 04.10.2010



ИЗУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ ПОДОФИЛЛОТОКСИНА И ЭТОПОЗИДА С ДНК МЕТОДОМ АБСОРБЦИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

А.П. АНТОНЯН¹, А.С. РЯЗАНОВА², Р.Р. ВАРДАПЕТЯН²

¹Ереванский госуниверситет, биологический факультет, кафедра биофизики

²Российско-армянский (Славянский) университет, медико-биологический факультет

Методом спектрофотометрического титрования исследовано комплексообразование подофиллотоксина и его полусинтетического производного - этопозиды с ДНК различного ГЦ-содержания. Получены значения константы ($K_{св}$) и числа мест (n) связывания этих лигандов с ДНК. Обнаружено, что оба лиганда предпочтительнее связываются с ДНК с высоким АТ содержанием. Выявлено, что оба лиганда с ДНК связываются более чем одним способом. Показано, что $K_{св}$ этопозиды с ДНК имеет большее значение, чем $K_{св}$ подофиллотоксина.

*ДНК - подофиллотоксин (Ptox) – этопозид - спектры поглощения
- преобразование Скetchарда*

Հետազոտվել է տարբեր GC -պարունակությամբ ԴՆԹ-ների հետ պոդոֆիլոտոքսինի և նրա կիսասինթետիկ ածանցյալի էտոպոզիդի կոմպլեքսացոյացումը սպեկտրոֆոտոմետրիկ տիտրման մեթոդով: Ստացվել են ԴՆԹ-ի հետ այդ լիգանդների կապման հաստատունի (K_b) և կապման տեղերի թվի (n) արժեքները: Ցույց է տրվել, որ երկու լիգանդներն էլ նախընտրելիորեն կապվում են բարձր АТ-պարունակությամբ ԴՆԹ-ի հետ: Բացահայտվել է, որ երկու լիգանդները ԴՆԹ-ի հետ կապվում են մեկից ավելի եղանակներով: Ցույց է տրվել, որ ԴՆԹ-ի հետ էտոպոզիդի կապման հաստատունը ավելի մեծ արժեք ունի, քան պոդոֆիլոտոքսինի դեպքում:

*ԴՆԹ – պոդոֆիլոտոքսին (Ptox) – էտոպոզիդ – կլանման սպեկտրներ –
Սկetchարդի ձևափոխում*

The complex formation of podophyllotoxin and its semi synthetic derivative – etoposide with DNA of different GC-content has been investigated by the spectrophotometric titration method. The values of binding constant (K_b) and number of binding sites (n) of these ligands with DNA have been received. It has been revealed, that both ligands preferably bind with DNA of high AT-content. It has been shown, that the value of K_b of etoposide with DNA is higher, than in the case of podophyllotoxin.

DNA – podophyllotoxin (Ptox) – etoposide – absorption spectra – Scetchard transformation

Взаимодействие низкомолекулярных веществ – лигандов с ДНК исследуется различными методами (абсорбционным, флуориметрическим, ЯМР и т.д.), которые позволяют обнаружить не только структурные особенности комплексов, но и определить термодинамические параметры связывания [3,9,16]. При этом, для анализа экспериментальных данных по адсорбции лигандов на макромолекуле важным является достижение состояния, когда все места на макромолекуле, доступные для связывания, полностью заняты лигандом [21].

Известно, что подофиллотоксин (Ptox) и его синтетические и полусинтетические производные обладают биологической активностью и проявляют цитотоксичность, подавляя процесс удвоения ДНК посредством связывания с топоизомеразой I и II ДНК [4-5,7-8,10-11,14,20,22]. Однако в последнее время выявлено, что Ptox и его синтетические и полусинтетические производные, в частности этопозид, способны также непосредственно связываться с ДНК [8,27].

Лиганды связываются с ДНК ковалентно (некоторые металлосодержащие соединения, например, *cis*-диаминодихлоролатиний – *cis*-DDP) или нековалентно [6,12,15,17,23] различными механизмами – интеркаляционным, внешним или электростатическим и могут проявлять специфичность к определенным последовательностям или участкам ДНК [1-2,13,18-19,24-26]. Так, Hoechst 33258 (H33258) связывается внешне в малом желобке ДНК и проявляет ярко выраженную специфичность к АТ-последовательностям [13,18-19], бромистый этидий (БЭ) интеркалирует в плоскость пар оснований предпочтительно к пиримидин-пуриновым последовательностям [1-2,24-26].

Часто спектральные характеристики связанных и несвязанных молекул лигандов с ДНК существенно различаются, что позволяет определить термодинамические параметры – константу и число мест связывания при изучении взаимодействия лигандов с ДНК [1,25]. Целью данной работы явилось исследование взаимодействия подофиллотоксина и этопозидов с ДНК методом абсорбционной спектроскопии.

Материал и методика. В работе были использованы Ptox («Merk» Германия), эпиподофиллотоксин (этопозид) (ICN, Biomedicals, США), ДНК *Ceotridium perfringus* (среднее ГЦ-содержание ХГЦ=32%), тимуса телят (Calf Thymus) СТ (ХГЦ=42%), М. Lysod. (ХГЦ=712%) (Sigma, США). Соответствующие концентрации лигандов и ДНК получали путем разбавления маточных растворов. Маточные растворы лигандов готовили путем взвешивания сухих препаратов с последующим растворением в метаноле. Маточные растворы ДНК получали растворением сухих препаратов в 10 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7,0. Соответствующие концентрации ДНК определяли с помощью следующих коэффициентов экстинкции: $\epsilon_{260} = 7400 \text{ моль}^{-1} \text{ см}^{-1}$ для Cl. perfr. и $\epsilon_{260} = 6600 \text{ моль}^{-1} \text{ см}^{-1}$ для Calf Thymus и М. Lysod. В разработанной нами системе Ptox свободно растворяется в широком спектре концентраций в Na-фосфатном буфере. Все препараты были использованы без дополнительной очистки.

При исследовании раствор Ptox или этопозид титровали раствором ДНК в 10 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7,0. Спектры поглощения комплексов были получены в интервале длин волн – $220 \leq \lambda \leq 800 \text{ нм}$. Максимум поглощения раствора чистого лиганда соответствовал $\lambda = 290 \text{ нм}$, в то время как максимум поглощения полностью связанных с ДНК молекул лиганда соответствовал $\lambda = 292 \text{ нм}$. При регистрации поглощения комплексов Ptox или этопозид с ДНК концентрация лиганда оставалась постоянной, а концентрационное соотношение r_b изменялась в интервале – $0 \leq r_b \leq 0,5$, где $r_b = \text{лиганд/ДНК}$ (рас-считано на пару оснований ДНК).

На основании спектров поглощения определены параметры связывания из кривой адсорбции в координатах Скотчарда, построенных по уравнению [25]:

$$r / C_f = K(1 - nr) \left[\frac{1 - nr}{1 - (n-1)r} \right]^{n-1} . \quad (1)$$

При малых заполнениях кривая связывания имеет линейный вид

$$\frac{r}{C_f} = K(1 - (2n - 1)r) , \quad (2)$$

где r – число лигандов, приходящее на одно место связывания, C_f – концентрация лигандов в растворе, K – константа связывания [3]. Сопоставив формулу (2) с экспериментальными данными, можно определить K и n . Для получения r / C_f и r из спектров поглощения комплексов ДНК-лиганд определяли концентрацию несвязанного лиганда C_f с помощью уравнения:

$$\frac{C_f}{C_0} = \frac{A - A_\infty}{A_0 - A_\infty}, \quad (3)$$

где A - поглощение комплекса при данной концентрации лиганда, A_0 и A_∞ - поглощение полностью свободного и связанного лигандов, $C_0 = C_f + C_b$ - полная концентрация лиганда в растворе; $\tau = C_b/C_p$; C_b - концентрация связанного лиганда, C_p - концентрация фосфатных групп ДНК.

Приборы. Спектрофотометрические измерения проводили на двулучевом спектрофотометре UV-VIS UNICAM-SP8-100 (Англия). Измерение поглощения осуществляли в герметически закрытых кварцевых кюветах длиной оптического пути 1см. Средняя чувствительность прибора в рабочем диапазоне спектра, измеренная без образцов, равна $5 \cdot 10^{-5}$ единиц оптической плотности. Это соответствует изменению $\Delta I/I = 10^{-4}$, что в конечном итоге дает общую погрешность, не превышающую 3%.

Спектрофотометрическое титрование растворов осуществляли микропипеткой с общим объемом 10мкл ("Hamilton", США).

Значения поглощения образцов выводились на дисплей компьютера с помощью программы, обработанной доц. В. Элбакяном в среде программирования LabVIEW 7.0.

Результаты и обсуждение. Исследования взаимодействия лигандов с ДНК методом абсорбционной спектроскопии основаны на том, что зачастую спектры поглощения комплексов проявляют батохромный сдвиг в сторону более длинных волн по сравнению со спектром поглощения чистого лиганда и гипохромное уменьшение максимумов в интервале изменения длины волны в полосе поглощения данного лиганда (например, интеркаляторов, в частности в случае БЭ). Такая особенность спектральных характеристик лигандов при взаимодействии с ДНК позволяет провести количественный анализ экспериментальных данных при спектрофотометрическом титровании раствора лиганда раствором ДНК и на их основании построить кривую связывания.

Спектры поглощения растворов комплексов Ptoх и этопозид с ДНК зарегистрированы в интервале длин волн $220 \leq \lambda \leq 400$ нм (спектры не приведены). Необходимо отметить, что максимумы спектров поглощения лигандов при $\lambda = 290$ нм уменьшаются по мере увеличения концентрации ДНК при титровании растворов Ptoх и этопозид. При этом, во избежание разбавления раствора лиганда при титровании с раствором ДНК, в исследуемые образцы одновременно было добавлено соответствующее количество лиганда. Следовательно, уменьшение максимумов спектров комплексов обусловлено связыванием лигандов с ДНК, вследствие чего концентрация свободных молекул лиганда уменьшается, что приводит к соответствующему уменьшению поглощения. Из значений поглощений комплексов Ptoх-ДНК и этопозид-ДНК определены значения τ и C_f и получены кривые связывания, приведенные на рис.1. Как видно из рисунка, кривые связывания нелинейные в случае ДНК Cl. perfr. и Calf thymus, в то время как в случае ДНК M. lysod. кривая связывания прямолинейная. Нелинейные кривые связывания Ptoх и этопозид с ДНК Cl. perfr. и Calf thymus указывают на то, что имеет место, по крайней мере, два способа связывания, один из которых сильный (специфический), другой – слабый (неспецифический), в то время как в случае ДНК M. lysod. взаимодействие происходит одним способом [25].

На наличие специфического и неспецифического способов взаимодействия указывает тот факт, что наклон кривой при сильном связывании Ptoх с ДНК Cl. perfr. и Calf thymus меньше, чем наклон кривой при связывании этопозид с этими ДНК. В то же время участки на кривых, соответствующие слабому связыванию обоих лигандов с ДНК, совпадают друг с другом, а также с кривой связывания и Ptoх, и этопозид в случае ДНК M. lysod., что является подтверждением неспецифического связывания этих лигандов с ДНК и не зависит от нуклеотидного содержания нуклеиновой кислоты.

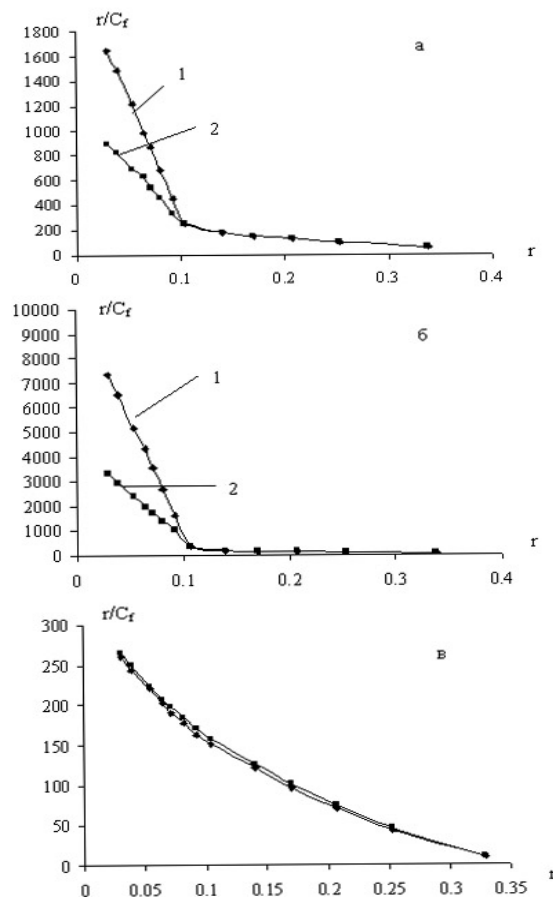


Рис.1. Кривые связывания Ptoх (а) и этопозид (б) с ДНК Cl. perfr. (1) и Calf thymus (2), а также Ptoх и этопозид с ДНК M.lysod. (в) в координатах Скетчарда.

На основании кривых связывания этих лигандов с ДНК получены значения параметров связывания – K и n , которые обобщены в табл. 1. Как видно из полученных данных, при специфическом связывании этих лигандов с ДНК соотношение констант связывания $K_{\text{этоп.}}/K_{\text{Ptoх}} \approx 5$ (табл.1). Этот результат указывает на то, что полусинтетическое производное этопозид прочнее связывается с ДНК, чем подофиллотоксин. Интересным является тот факт, что аналогичные результаты получены в случае ДНК Cl. perfr. и Calf thymus (рис. 1, а и б), в то время как в случае ДНК M. lysod. специфическое связывание не обнаруживается, а кривые связывания обоих соединений практически совпадают друг с другом (рис. 1, в). Более того, сродство этих лигандов к ДНК M. lysod. намного меньше, чем с ДНК Cl. perfr. и Calf thymus ($K \approx 103$), что указывает на то, что специфическими местами для связывания подофиллотоксина его производных являются АТ-богатые участки ДНК.

Неспецифическое же связывание Ptoх и этопозид с ДНК Cl. perfr. и Calf thymus, а также с ДНК M. lysod., по всей вероятности, происходит за счет взаимодействия с сахаро-фосфатным остовом, вследствие чего значения K совпадают друг с другом, как в случае ДНК различного ГЦ-содержания, так и в случае Ptoх и этопозид.

Значения же n_s в случае обоих лигандов практически совпадают, то есть число мест при специфическом связывании зависит не от типа лиганда, а от последовательности нуклеотидов в этих участках. На это указывает тот факт, что значения n_{ns} , полученные для второго способа связывания Ptox и этопозид с ДНК Cl. perfr. и Calf thymus, а также значение n , полученное для комплексов этих лигандов с ДНК M. lysod., совпадают.

Таблица 1. Значения константы K и числа мест n связывания Ptox и этопозид с ДНК различного ГЦ-содержания

ДНК	Ptox				Этопозид			
	K_s , $10^4 M^{-1}$	K_{ns} , $10^4 M^{-1}$	n_s	n_{ns}	K_s , $10^4 M^{-1}$	K_{ns} , $10^4 M^{-1}$	n_s	n_{ns}
Cl. perfr.	$2,2 \pm 0,0$ 2	$0,31 \pm 0,00$ 3	5,0	1,5	$10,0 \pm 0,04$	$0,32 \pm 0,003$	5,0	1,5
Calf thymus	$1,1 \pm 0,0$ 1	$0,32 \pm 0,00$ 3	4,0	1,5	$4,5 \pm 0,03$	$0,32 \pm 0,003$	4,5	1,5
M. lysod.	-	$0,31 \pm 0,00$ 3	-	2,0	-	$0,32 \pm 0,003$	-	2,0

K_s - значения K при специфическом связывании Ptox и этопозид с ДНК

K_{ns} - значения K при неспецифическом связывании Ptox и этопозид с ДНК

n_s - значения n при специфическом связывании Ptox и этопозид с ДНК

n_{ns} - значения n при неспецифическом связывании Ptox и этопозид с ДНК

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что подофил-лотоксин и его полусинтетическое производное этопозид связываются с ДНК двумя способами: с ярко выраженной специфичностью к АТ-последовательностям и ограниченными местами связывания и неспецифически.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вардеванян П.О., Антонян А.П., Парсаданян М.А., Давтян А.Г., Карапетян А.Т. Связывание БЭ с одноцепочечной ДНК. Биофизика, 48, 4. С. 644-647, 2003.
2. Вардеванян П.О., Антонян А.П., Парсаданян М.А., Пирумян К.В., Бояджян З.Р., Карапетян А.Т. Влияние ионной силы на взаимодействие Hoechst 33258 с ДНК. Вестник МАНЭБ, 2005, том 10, N 5, вып. 2, стр. 145-150.
3. Arakelyan V.B., Babayan Yu.S., Potikyan G. Determination of constant rates of adsorption of ligand on DNA: Analysis of correlation functions. J.Biomol. Struct. Dyn., 18, 2. p. 231-235, 2000.
4. Anyanwutaku I.O., Guo X., Chen H.X., et al. Activities of novel nonglycosidic epipodophyllotoxins in etoposide-sensitive and resistant variants of human KB cells, P-388 cells, and in vivo multidrug-resistant murine leukemia cells. Mol. Pharmacol, 49, p. 721-726, 1996.
5. Allevi P., Anastasia M., Ciuffreda P., Bigatti E., Macdonald P. Stereoselective glucosidation of Podophyllum lignans. A new simple synthesis of etoposide. J. Organic Chemistry, 58, p. 4175-4178, 1993.
6. Alonso A., Almendral M.J., Curto Y., Criado J.J., Rodriguez E., Manzano J.L. Determination of the DNA-binding characteristics of ethidium bromide, proflavine, and cisplatin by flow injection analysis: Usefulness in studies on antitumor drugs. Anal. Biochem., 355, p. 157-164, 2006.
7. Beers S.A., Imakura Y., Dai H.J., Li D.H., Cheng Y.C., Lee K. Antitumor agents, 99. Synthetic ring C aromatized podophyllotoxin analogues as potential inhibitors of human DNA topoisomerase II. J. Nat. Prod. 51, 5, p. 901-906, 1998.

8. Bastow K.F., Wang Hui-Kang, Cheng Yung-Chi, Lee Kuo-Hsiung. Antitumor agents-CLXXIII. Synthesis and evaluation of camptothecin-4 β -amino-4'-O-demethyl epipodophyllotoxin conjugates as inhibitors of mammalian DNA topoisomerases and as cytotoxic agents. *J. Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 5, 8, p. 1481-1488, 1997.
9. Chaires J.B. Energetics of drug-DNA interactions. *Biopolymers*, 44, p. 201-215, 1998.
10. Damayanthi Y., Lown J. Podophyllotoxins: current status and recent developments. *Curr Med Chem.*, 5, p. 205-252, 1998.
11. Felix C.A. Leukemias related to treatment with DNA topoizomerase II inhibitors. *Med. Pediatr. Oncol.* 36, 5, p. 525-535, 2001.
12. Hambley T.W. Platinum binding to DNA: structural controls and consequences. *J. Chem. Soc. Dalton Trans*, p. 2711-2718, 2001.
13. Ismail M.A., Rodger P.M., Rodger A. Drug self-assembly on DNA: sequence effects with trans-bis-(4-N-methylpyridiniumyl)diphenyl porphyrin and Hoechst 33258. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 11, p. 335-348, 2000.
14. Jyothi P., Jagetia G., Krishnamurthy H. Evaluation of teniposide (VM-26)-induced toxicity on mouse spermatogenesis by flow cytometry. *Toxicology*, 163, 2-3, p. 163-174, 2001.
15. Jakupec M.A., Galanski M., Keppler B.K. Tumor-inhibiting platinum complexes: state of the art and future perspectives. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 146, p. 1-53, 2003.
16. Lane A.N., Jenkins T.C. Thermodynamics of nucleic acids and their interactions with ligands. *Q. Rev. Biophys.*, 33, 3. p. 255-306, 2000.
17. Lippert B. Cisplatin, Wiley-VCH, Zurich, Switzerland, 1999.
18. Loontjens F.G., Refenfuss P., Zechel A., Dumortier L., Clegg R.M. Binding characteristics of Hoechst 33258 with calf thymus DNA, poly[d(AT)], and d(CCGGAATTCCGG): multiple stoichiometries and determination of tight binding with a wide spectrum of site affinities. *Biochemistry*, 29, p. 9029-9039, 1990.
19. Loontjens F.G., McLaughlin L.W., Diekmann S., Clegg R.M. Binding of Hoechst 33258 and 4',6-diamino-2-phenylindole to self-complementary decaeoxy nucleotides with modified exocyclic base substituents. *Biochemistry*, 30, p. 182-189, 1991.
20. Macdonald T., Lehnert E., Loper J., et al. On the mechanism of interaction of topoisomerase II with chemotherapeutic agents. In: Potmesil M, Kohn KW editors. *DNA topoisomerases in cancer*. NY: Oxford University Press, p. 199-214, 1991.
21. Nechipurenko Yu.D., Mikheikin A.L., Streltsov S.A., Zasedatelev A.S., Nabiev I.R. Mixed mode of ligand-DNA binding results in S-shaped binding curves. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 18, 5, p. 1-7, 2001.
22. Rubin E., Hait W. Anthracyclines and DNA intercalators / epipodophyllotoxins / DNA topoisomerases. *Cancer Medicine*, Inc. London. p. 670-679, 2000.
23. Sundquist W.I., Lippard S.J. The coordination chemistry of platinum anti-cancer drugs and related compounds with DNA. *Coord. Chem. Rev.*, 100, p. 293-322, 1990.
24. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Manukyan G.A., Karapetyan A.T. Study of ethidium bromide interaction peculiarities with DNA. *Exp. and Mol. Medicine*, 33, 4. p. 205-208, 2001.
25. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Davtyan H.G., Karapetyan A.T. The binding of ethidium bromide with DNA: interaction with single- and double-stranded structures. *Exp. and Mol. Medicine*, 35, 6, p. 527-533, 2003.
26. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Pirumyan K.V., Muradyan A.M., Karapetian A.T. Influence of ionic strength on Hoechst 33258 binding with DNA. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 25, 6, p. 641-646, 2008.
27. <http://en.wikipedia.org/wiki/Etoposide>.

Поступила 05.10.2010.



Биол. журн. Армении, 4 (62), 2010

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЯДОВ ЛЕВАНТИЙСКОЙ (*MACROVIPERA LEBETINA OBTUSA*) И АРМЯНСКОЙ (*MONTIVIPERA RADDEI RADDEI*) ГАДЮК

A.B. ВОСКАНИЯН, М.В. АНТОНЯН, С.С. ГЕВОРГЯН

Институт физиологии им.акад.Л.А.Орбели НАН РА, лаборатория пурификации,
сертификации и стандартизации физиологически активных веществ
www.neuroscience.am; avvoskanyan@rambler.ru.

Впервые проведено сравнительное исследование действия летальных доз ядов левантийской (*Macrovipera lebetina obtusa*) и армянской (*Montivipera raddei raddei*) гадюк для физиологических экспериментов. Полученные данные представляют ценность для медико-биологических исследований с использованием ядов гадюк.

Токсичность ядов – гюрза кавказская – гадюка армянская – LD_{50}

Առաջին անգամ կատարվել է լևանտիկյան (*Macrovipera lebetina obtusa*) և հայկական իծերի (*Montivipera raddei raddei*) թույների մահացու դեղաչափերի ազդեցության համեմատական հետազոտություն ֆիզիոլոգիական փորձերի համար: Ստացված տվյալները արժեք են ներկայացնում այն բժշկականսարանական հետազոտությունների համար, որտեղ օգտագործվում են իծերի թույները:

Թույների տոքսիկություն - գյուրզա կովկասյան - իծ հայկական - LD_{50}

Comparative study of Levantine (*Macrovipera lebetina obtusa*) and Armenian (*Montivipera raddei raddei*) viper's venoms lethal doses action for the first time was carried out for physiological experiments needs. Obtained data are usable for medicinal and biological investigations with this venoms treatment.

Venoms toxicity – Caucasian Levantine viper – Armenian viper – LD_{50}

В последние годы возрос интерес к физиологически активным веществам, продуцируемым различными классами животных. В основе этого лежит огромное разнообразие химических соединений, которые могут быть использованы в самых различных отраслях народного хозяйства – от новых лекарственных препаратов в медицине до инсектицидов в сельском хозяйстве и питательных кремов в косметической промышленности. Это физиологически и фармакологически активные вещества, получаемые от медуз и улиток, жаб и саламандр, змей и пауков. Одни продукты жизнедеятельности животных используются в нативном виде, другие – после фракционирования и пурификации, третьи становятся прототипами семейств синтетических аналогов с улучшенными свойствами. При этом в кругу интересов многих исследователей всегда были и остаются животные яды. Огромный объем работ посвящен различным компонентам ядов змей, которые проявляют самые разные свойства – факторов роста, ферментативной активности, сигнальных молекул, дезинтегрирующих и апоптотических систем и т.п. [8]. С другой стороны, не ослабевает интерес к цельным ядам как хорошо отработанной со стороны эволюции системы, предназначенной для питания и защиты змей [4,6,7].

Давно известно, что существуют принципиальные различия между действием ядов нейротропного и гемотропного действия. Для яда кобр при наличии токсинов, блокирующих передачу в нейромышечном синапсе, разница в токсичности в зависимости от пути введения очень мала [2], в то время как для яда гадюковых место введения имеет большое значение. Однако в последние годы все большее число исследований свидетельствует о том, что имеется ощутимая разница в составе и модусе действий ядов в пределах одного и того же вида, обитающего в различных природных условиях и климатических зонах. Данная работа посвящена определению токсичности яда гюрзы кавказской, живущей в природных условиях на территории Армении, и сравнительному исследованию токсичности ядов двух ядовитых змей фауны Армении – гюрзы или левантийской гадюки (ЛГ) и армянской гадюки (АГ). Яд ЛГ проявляет ярко выраженные гемотропные свойства в гемолизе, геморрагии, протеазной активности и т.п., в то время как яд АГ считается ядом смешанного типа, то есть наряду с гемотропным действием, имеет выраженные нейротоксические свойства. Также исследованы некоторые вопросы, связанные с путями введения яда ЛГ, что имеет важное значение для вычисления летальных доз при воздействии на человека [5].

Материал и методика. Эксперименты были проведены на 140 половозрелых самцах белых мышей-альбиносов и 12 половозрелых самцах белых крыс-альбиносов. Исходя из принципиальных соображений по чистоте экспериментов, выживших животных использовали только для кормления змей. Летальную дозу, при которой погибало 50% животных по прошествии 24 ч после введения яда (LD_{50}), определяли по методу Беренса [3].

Исследования по охлаждению мышц, инокулированных ядом гюрзы, были проведены на четырех половозрелых крысах-самцах, наркотизированных нембуталом дозой 40 мг/кг массы животного. С обеих сторон в области, примыкающей к ягодичным мышцам, вводили яд, после чего с экспериментальной стороны накладывали водяной медный радиатор, который охлаждал мышцу до температуры на два градуса выше температуры водопроводной воды (рис.1). Контроль температуры проводили электронным термометром с точностью измерения $0,2^{\circ}\text{C}$. Площадь повреждения оценивали в соответствии с площадью геморрагического отека.



Рис.1. Наркотизированная крыса с откинутой шкуркой и обнаженными мышцами; слева на мышце установлен охлаждающий радиатор.

Результаты и обсуждение. Токсичность яда ЛГ впервые была определена нами в 90-х годах прошлого столетия [1]. Эта величина при внутрибрюшинном введении для белых лабораторных крыс и мышей (альбиносов) составила 1,8-1,9 мг/кг массы животных, что было несколько меньше (а стало быть токсичность была несколько выше), чем аналогичные данные литературы по среднеазиатской гюрзе (тогда еще *Vipera lebetina turanica*) [2].

При определении токсичности яда ЛГ при внутримышечном введении оказалось, что действие яда значительно ослабляется и LD_{50} для мышей составляет около 3,5 мг/кг массы (рис.2).

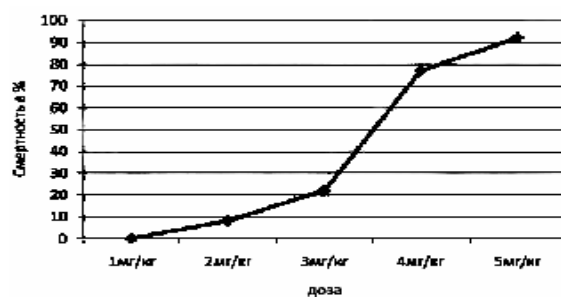


Рис.2. Смертность мышей при внутримышечном введении яда гюрзы кавказской.

Довольно неожиданные данные были получены при подкожном введении яда ЛГ: токсичность яда была очень низкой и составила около 23 мг/кг массы мышей (рис.3).

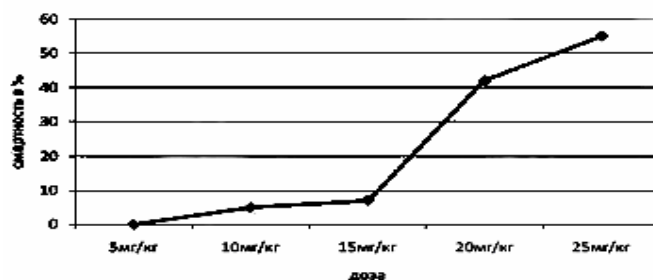


Рис. 3. Смертность мышей при подкожном введении яда гюрзы кавказской.

При рекогносцировочном определении токсичности яда АГ мы взяли почти те же дозы, что и для ЛГ, однако выяснилось, что яд АГ несколько токсичнее (рис.4) и нам пришлось протестировать также диапазон меньших доз (рис.5).

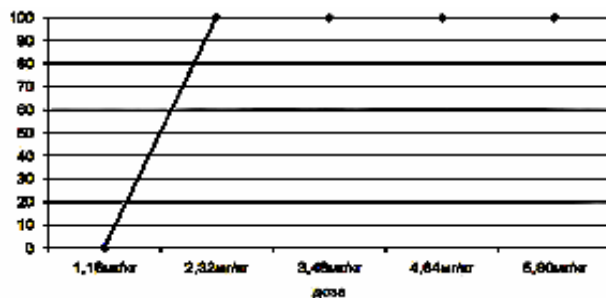


Рис.4. Смертность мышей при внутрибрюшинном введении яда гадюки армянской. (Предварительное определение диапазона доз, на оси ординат отложен процент смертности мышей).

Токсичность яда АГ при внутрибрюшинном введении оказалась равной 1,6 мг/кг живой массы мышей. Однако при сравнительном анализе токсичности ядов двух видов змей фауны Армении было, выявлено, что при малых дозах (до 50%) токсичнее яд гюрзы, в то время как при высоких – яд армянской гадюки (рис.6).

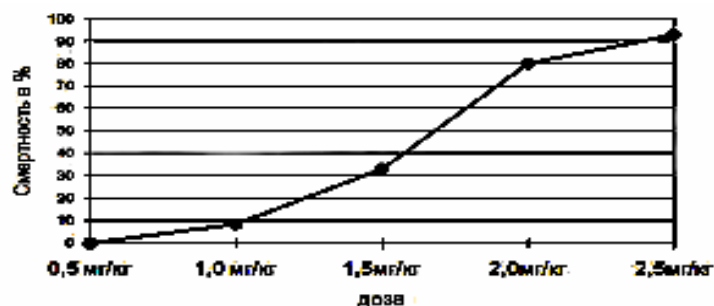


Рис.5. Смертность мышей при внутрибрюшинном введении яда гадюки армянской.

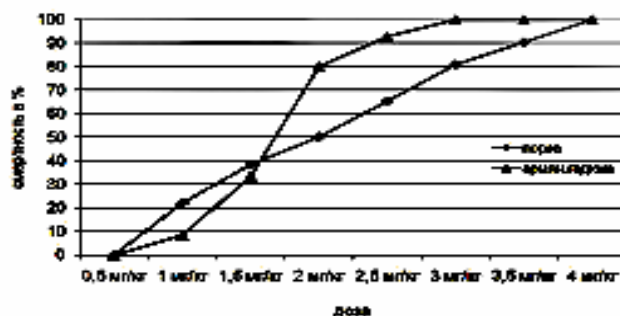


Рис.6. Смертность мышей при внутрибрюшинном введении ядов гюрзы кавказской и гадюки армянской.

При исследовании казеинолитического действия яда ЛГ *in vitro* определяли Q10. Выяснилось, что в зависимости от применяемой дозы яда и температуры среды, в которой работает фермент, возможно изменение сценария протекания деструктивных процессов в организме интоксичированного животного (рис.7).

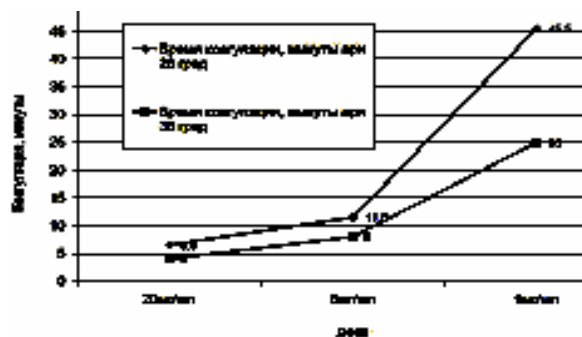


Рис.7. Время коагуляции молока под воздействием яда гюрзы различной степени разведения (1, 5 и 20 мг/мл молока) при различной температуре (28°C и 38°C).

Аналогичное явление наблюдается и в самом организме при охлаждении участка тела, куда был введен яд гюрзы. Под охлаждающим водяным радиатором в области дорзальных мышц задней конечности температура была ниже на 8°C (26°C на контрольной стороне и 18°C на охлаждаемой). Визуальная оценка позволила заключить, что распределение яда в охлажденной мышце было по площади меньше, чем в контрольной в 1.7-2.0 раза.

Необходимо отметить, что подкожное введение яда гюрзы малоэффективно как для самой змеи, так и при научных исследованиях по причине стаза яда в подкожной жировой клетчатке, а температура внешних покровов животных ниже почти на 8-10⁰С по сравнению с температурой брюшины. Это означает, что при исследованиях действия яда ЛГ *in vivo* необходимо учитывать пути его введения, а *in vitro* также температуру среды и адекватность мишени. Мощное деструктивное действие ферментов и активных полипептидных соединений яда гюрзы при дозах, равных половине или четверти летальной, позволяет утверждать, что лечебный эффект этого яда чаще всего необходимо исследовать при гораздо больших разведениях (e.g. 1.10⁻⁶ и более), чем это применяется во многих исследованиях. Дозозависимое действие при исследовании отдельных фракций и интерпретация действия отдельных компонентов принципиально различны от комплексного действия цельного яда и понимания целесообразности их суммарного воздействия. Особенно осторожно нужно использовать данные, полученные *in vitro* при интерпретации действия яда на организм, потому что особое влияние токсинов яда на сердечно-сосудистую и нервную системы, особенно на симпатический отдел ВНС, вызывает реакции организма, принципиально отличные от реакций культуры ткани или пула нейронов в переживающих срезах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Восканян А.В. Некоторые аспекты исследований животных ядов в Армении. Журн. Вопр. теор. и клинич. медицины, 2, 7, с.58-62, 1999.
2. Орлов Б.Н., Гелашивили Д.Б., Ибрагимов А.К. Ядовитые животные и растения СССР., М. "Высшая школа", 272с., 1990.
3. Правдин Н.С. "Токсикология", М. , Изд-во "Медицина", 280с., 1973.
4. Bonnemain B. Helix and Drugs: Snails for Western Health Care From Antiquity to the Present. Med. 2005 Mar; 2, 1, 25-28. Epub Jan 28, 2005.
5. Evid Based Complement Alternat Khare AD, Khole V, Gade PR. Toxicities, LD50 prediction and in vivo neutralisation of some elapid and viperid venoms. Indian J Exp Biol. Dec; 30, 12, 1158-62, 1992
6. Perchuc AM, Menin L, Stocklin R, Buhler B, Schoni R. The potential of Bothrops moojeni venom in the field of hemostasis. Established use and new insights. Pathophysiol Haemost Thromb. 34 (4-5): 241-5, 2005.
7. Raghuraman H, Chattopadhyay A. Effect of micellar charge on the conformation and dynamics of melittin. Eur Biophys J. Nov; 33, 7, 611-22, 2004.
8. Schmidt JT, Lemere CA. Rapid activity-dependent sprouting of optic fibers into a local area denervated by application of beta-bungarotoxin in goldfish tectum. J Neurobiol. Jan; 29, 1, 75-90, 1996.

Поступила 14.07.2010.



Biol. Journal of Armenia, 4 (62), 2010

NEW DATA ON AGRICULTURE OF APARAN-III EARLY BRONZE AGE SETTLEMENT (ARMENIA)

R.A. HOVSEPYAN

Institute of Archaeology and Ethnography NAS RA, Group of Archaeobiology

The grain hoard from vessel at Early Bronze Age (end of IV millennium calibrated B.C.) Aparan III mountainous settlement has been studied. It mostly consists of cultivated barley and wheat charred grains mixture with very few seeds of weeds. The barley was represented with hulled two-rowed and six-rowed varieties. The wheat grains almost certainly belong to bread wheat, particularly common bread wheat and club wheats. In general the recorded archaeobotanical situation is common for the EBA mountainous sites of Armenia. The only essential difference from higher situated sites is the larger amount of wheat (44%) in cereals ratio at Aparan III, which supposedly is due to altitudinal and climatic differences.

Archaeobotany – prehistoric agriculture – cereals – Bronze Age

Հետազոտվել է Ապարան III վաղ բրոնզեդարյան (մ.թ.ա. IV հազարամյակի վերջ, ճշգրտված) լեռնային բնակատեղի կավանդներից մեկում հայտնաբերված հացահատիկային պաշարը: Այն կազմված է հիմնականում մշակովի գարու և ցորենի ածխացած հատիկներից և մոլախոտերի մի քանի սերմերից: Գարին այստեղ ներկայացված է թեփուկավոր երկշարք և բազմաշարք վարիացիաներով: Ցորենի հատիկները ամենայն հավանականությամբ պատկանում են փափուկ ցորենին, մասնավորապես՝ սովորական փափուկ և կունդիկ ցորեններին: Ընդհանուր առմամբ նկարագրված իրավիճակը բնութագրական է Հայաստանի լեռնային վաղ բրոնզեդարյան հնավայրերի համար: Ավելի բարձրադիր հնավայրերի համեմատությամբ միակ էական տարբերությունը ցորենի համեմատաբար մեծ քանակությունն է (44%) հացաբույսերի հարաբերակցությունում Ապարան III-ում, որը ենթադրում ենք, որ կապված է տեղանքի բարձրության և կլիմայական տարբերությունների հետ:

Հնարուսաբանություն – մինչպատմական բուսաբուծություն – հացազգի մշակաբույսեր – բրոնզի դար

Исследовался зерновой запас в одном из керамических сосудов из ранне-бронзового (конец IV тысячелетия до нашей эры, калиброванный) высокогорного поселения Апаран III. Он состоит в основном из обугленных зерен ячменя и пшеницы и нескольких семян сорняков. Ячмень представлен пленчатой двурядной и многорядной вариациями. Зерна пшеницы, по всей вероятности, принадлежат к мягкому сорту, в частности к обыкновенной мягкой и карликовой пшенице, что характерно для раннебронзовых горных памятников Армении. Единственным отличием от прежних находок является сравнительно высокое количество пшеницы (44%) в соотношении зерновых в Апаране III, что, возможно, связано с высотными и климатическими различиями.

Археоботаника – предысторическое растениеводство – культурные злаки — бронзовый век

The territory of Armenia contains archaeobotanical evidences from several Early Bronze Age settlements (Gegharot, Aparan III, Tsaghkasar, Voskevaz, Aragatsi-berd, Mokhrablur, Lorut, Aygevan, Elar (P₃), Shengavit), but not all of those sites provide enough material to recover agriculture of the past (e.g. Mokhrablur, Elar (P₃)). The plant assemblages recovered from above mentioned EBA sites are known and repeat each other [4]. The territory of Armenia has also expressed by vertical zonality, which in all probability caused some differences also in past agricultures. But there was no evidence for agricultural differences in different vertical zones for prehistoric territory of Armenia. In general only Gegharot and Aparan III sites provide several hundred and more grains and good for quantitative analysis, which could be useful medium for uncovering some differences in EBA agricultures at different altitudes. The aim of the current work is to study archaeobotanical situation in Aparan III site and find out differences in agricultures of that site from Gegharot settlement - another higher situated mountainous site of the same period and close distance.

Early Bronze Age settlement Aparan III is situated in the plain of Aparan (Aragatsotn marz), on the right bank of Qasakh river, at the altitude of 1860 m above sea level. Several clay vessels are found at the site and some of those pots contained charred grains (excavations of 2000). Ground stones were also found. The site belongs to the end of IV millennium B.C. This fact has been confirmed with radiocarbon dating of charred grains mass (AA-40153, BP: 4455±75, cal BC (1σ): 3340-3210, cal BC (2σ): 3350-2920; LY-10623, BP: 4321±33, cal BC (2σ): 3015-2884; Bln-5528, BP:4428±39, cal BC (1σ): 3270-2920, cal BC (2σ): 3330-2910). The culture of the site belongs to the first phase of Kura-Araxian culture [6,1].

The part of grain mass recovered from large jars (karas) had been studied by P.A. Ghandilyan [6, 1]. The following species had been identified by him (the first Latin names are given as those were published (in [6]), and in {} brackets and in following text Latin names are given according to recent taxonomical system): two-rowed barley (*Hordeum distichum* {=*Hordeum vulgare* subsp. *distichon*}), multi-rowed barley (*H. vulgare* {=*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*}), bread wheat (*Triticum aestivum* {=*T.aestivum* subsp. *vulgare*}), club wheat (*T.compactum* {=*T. aestivum* ssp. *compactum*}) and mouse barley (*Hordeum murinum*). Ghandilyan noticed that the barley is prevailing in sample and the majority of it is hulled variety but there is naked variety as well. We believe that P. Ghandilyan have identified as naked grains the hulled ones, which lost their flower glumes during charring and following thousands years of corrosion; reexamination of that material did not reveal any naked barley grains. Gandilyan noticed also the purity of the grain mass: by him the weeds practically are absent, only *Hordeum murinum* was noted as weed [6, 1].

Materials and methods. Archaeobotanical material was recovered from an Early Bronze Age vessel excavated from Aparan III settlement. Carpological material was mixed with burnt organic mass remained as charred dust. The sample was divided into three parts; first third passed to P. Ghandilyan, second third to us and the rest used for radiometric dating analyzes. Our subsample of charred grains containing mass with approximately 1 liter volume was processed to separate carpological macroremains. It is known that contact of charred material with water is supporting destruction process. To shrink that negative effect of water processing, the sample was firstly dry sieved with two level sieves (0.25 mm and 1 mm mesh sizes) and all visible plant macroremains were picked up. After that procedure the rest with some plant macroremains left was wet-sieved to uncover unrecognized remains. After drying this part also was picked up for macroremains.

Total 4 482 units of carpological material have been recovered. There were no charcoal fragments in the sample.

Results and Discussion. 21 taxa of Higher Plant are identified in the studied material. The most of carpological material are charred cereals grains, in comparably pure state - 96.6% and the weeds seeds and fruits consist only 3.4% of total carpological material (Fig. 1).

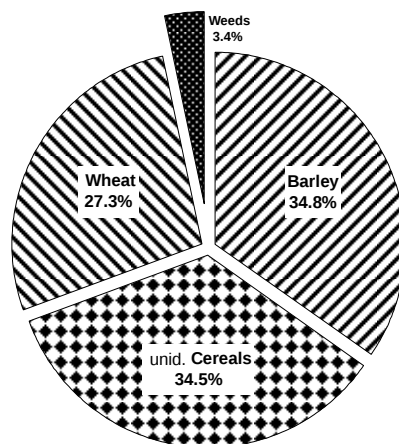


Fig. 1. Ratio of unidentified cereals, wheat, barley and weeds in Aparan III sample.

The cereals grains are comparably well preserved; it was possible to identify at least genera of practically all complete grains. In addition, there are also cultivated cereals grain fragments. The 56.1% of genus identifiable cultivated cereals grains are barley grains, 43.9% - wheat grains (Table 1).

As recovered wheat grains are morphologically very similar with naked bread wheat and as there are not any features which could reject the belonging of those grains to it we identified those as *Triticum* cf. *aestivum*. It is possible to distinguish two main groups of wheat grains, which we conventionally called *T. cf. aestivum* subsp. *vulgare* and *T. cf. aestivum* ssp. *compactum* (Table 1, Fig. 2:1-6).

All recovered barley grains belong to hulled varieties of cultivated barley (*Hordeum vulgare*). The presence of asymmetric, slightly bent and smaller triplet lateral grains (Fig. 2:9-11) is evidence of multi-rowed hulled barley presence (*H. vulgare* ssp. *vulgare* convar. *vulgare*). The portion of triplet lateral grains is less than 2/3 of total, which means that hulled two-rowed barley (*H. vulgare* ssp. *distichon* convar. *distichon*) also present in the sample (Fig. 2:7-11).

The taxonomical composition of recovered weeds is not large: *Lolium* sp. (Fig. 3:1-3), poaceous plant (possibly bad preserved *Lolium* sp. kernels), *Rumex* sp. (very bad preserved nutlets; Fig. 3:4), *Polygonum* sp., *Neslia* sp. (Fig. 3:5), Fabaceae gen. sp., Viceae gen. sp., *Buglossoides arvensis*, *Rochelia* sp., *Lycopsis/Anchusa/Nonea* sp., *Galium* cf. *spurium*, *Convolvulus* cf. *arvensis* and one unidentified plant. Eremis of some species of *Lycopsis*, *Anchusa* and *Nonea* genera are morphologically very similar and the only find from Aparan-III is very bad preserved. All fabaceous plants seeds, single finds of *Polygonum* nutlet and *Neslia* capsule are uncharred, erems of Boraginaceae and Convolvulaceae families species are biomineralized (as those are usually being in the most of recovered archaeobotanical materials), while other taxa seed material is charred. We are doubtful concerning the age of fresh look fabaceous seeds and *Polygonum* nutlet; presence of those in carbonized grain hoard could be result of contamination with recent seeds. Excluding those non-charred seeds from our calculations will reduce ratio of weeds down to 2.7% (instead of 3.4%) and will increase the crop ratio up to 97.3% (instead of 96.6%). All above-mentioned weeds are common for the studied region.

Table 1. Archaeocarpological material from Aparan III Early Bronze Age settlement

Plant Taxa		Total	4,482
CULTIVATED CEREALS (Gramineae), carbonized grains; Total		4,329	96.59%
Triticeae gen. spp. /grains unidentifiable fragments/		1,547	34.52%
Barleys (<i>Hordeum vulgare</i> L.), Total		1,560	34.81%
<i>Hordeum vulgare</i> (hulled)	triplet position unidentifiable hulled grains	898	20.04%
	triplet middle hulled grains	312	6.96%
<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> convar. <i>vulgare</i>	triplet left hulled grains	200	4.46%
	triplet right hulled grains	150	3.35%
<i>H. vulgare</i> ssp. <i>distichon</i> (L.) Koern. convar. <i>distichon</i>	triplet middle hulled grains	+	+
Wheats (<i>Triticum</i> spp.), Total		1,222	27.26%
<i>T. aestivum</i> L. / <i>turgidum</i> L.		397	8.86%
<i>T. cf. aestivum</i> L. ssp. <i>vulgare</i> (Vill) MacKey		767	17.11%
<i>T. cf. aestivum</i> ssp. <i>compactum</i> (Host) MacKey		22	0.49%
<i>T. cf. aestivum</i> ssp. <i>spelta</i> (L.) Thell.		4	0.09%
<i>T. cf. aestivum</i> ssp. (small grained)		22	0.49%
<i>T. cf. turgidum</i> L. conv. <i>durum</i> (Desf.) MacKey		4	0.09%
<i>T. cf. turgidum</i> ssp. <i>dicoccum</i> (Schrank) Schuebl.		6	0.13%
WEEDS, Total		153	3.41%
Poaceae, carbonized grains			
<i>Lolium</i> sp.		15	0.33%
Poaceae gen. sp.		53	1.18%
Fabaceae, uncharred seeds			
Viceae gen. sp.		4	0.09%
Fabaceae gen. sp. (<i>Medicago</i> / <i>Melilotus</i> sp.?)		20	0.45%
<i>Trifolium</i> sp.		10	0.22%
Boraginaceae, biomineralized erems			
<i>Buglossoides arvensis</i> (L.) Johnst.		1	0.02%
<i>Rochelia</i> sp.		1	0.02%
<i>Lycopsis orientalis</i> / <i>Anchusa ovata</i> / <i>Nonea pulla</i>		4	0.09%
Polygonaceae, nutlets			
cf. <i>Rumex</i> sp., charred		31	0.69%
<i>Polygonum</i> sp., uncharred		1	0.02%
Rubiaceae			
<i>Galium</i> cf. <i>spurium</i> , charred mericarps		8	0.18%
Convolvulaceae			
<i>Convolvulus</i> cf. <i>arvensis</i> L. , biomineralized erems		3	0.07%
Brassicaceae			
<i>Neslia</i> sp. , uncharred capsule		1	0.02%
Unidentified, charred nutlet (Lamiaceae gen. sp.?)		1	0.02%

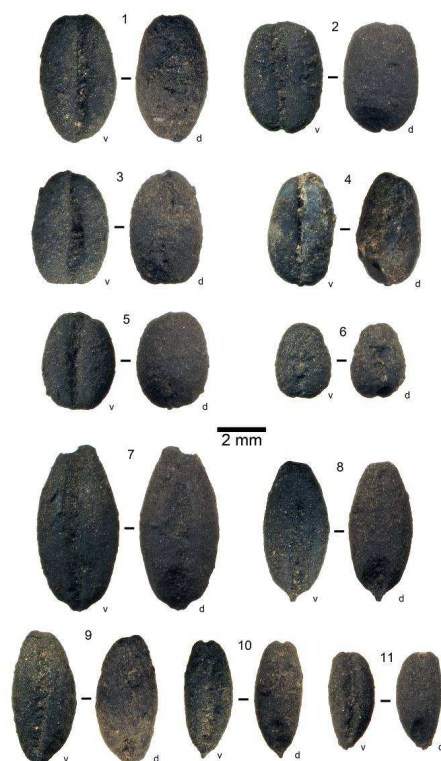


Fig. 2. Charred grains from Aparan III Early Bronze Age settlement
 1-6 - *Triticum aestivum/turgidum*, 7-11 - hulled *Hordeum vulgare*:
 7-8 - triplet middle grains, 9-11 - triplet left grains.
Notes: v - ventral side, d - dorsal side.

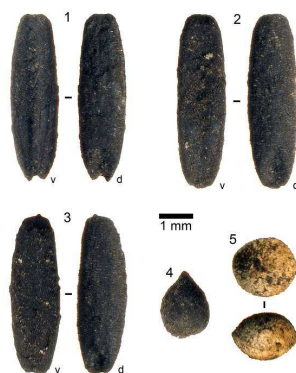


Fig. 3. Some weeds carpological material from Aparan III Early Bronze Age settlement.
 1-3 - *Lolium* sp., charred kernels, 4 - *Rumex* sp., charred nutlet,
 5 - *Neslia* sp., mineralized capsule. **Notes:** v - ventral side, d - dorsal side.

There is strongly expressed vertical zonality in the territory of Armenia and supposedly the agriculture varied in different altitudes also in the past. It is possible to find out some qualitative and quantitative differences in the agricultures of the past with use of archaeobotanical methods. We had aim to compare agricultures of the same period populations lived in different altitudinal zones. Particularly differences between assemblages of cultivated plants and weeds, cultigens - weeds ratios and ratio of cultigens are the main characteristics, which we are going to recover. There is more or less detailed study on high mountainous Early Bronze Age agriculture of Tsaghkahovit plain (by archaeobotanical evidence from Gegharot EBA settlement; [4,2]). For this case we studied archaeobotanical situation in Aparan III site and compared the agriculture of it with that one of Gegharot site. Tsaghkahovit and Aparan plains are practically in the same geographical region, middle mountainous zone and only altitudes are different: Aparan III is on 1860 m a.s.l. and plain part of Gegharot site is on 2100 m a.s.l. (difference is ~240 m).

Some notes on modern environmental conditions of the studied areas. Each type of soils has been formed under specific bio-climatic conditions during comparably long time - centuries and millennia. Reformation of soil under change of climate and vegetation again takes long time. The soils around of studied sites are de-carbonated mountain-chernozems (blackearth) with carbonates in deep slices, which is evidence that soils of those areas were formed under common bio-climatic conditions. Several characteristics of those soils, especially the fact that carbonates moved into deeper layers and high concentration of humus (5-12%) is evidence that those soils are formed under comparably humid and cool conditions [5]. The vegetation cover in both studied areas is presented with meadow-steppe vegetation [3]. Both sites are in Aparan floristic region [7]. Unlike of soil and vegetation cover the agro-climatic characteristics of Tsaghkahovit (Gegharot) and Aparan regions are differ (Table 2).

Table 2. Some geographic and resent climatic differences between Aparan III and Gegharot sites environs [1].

Region	Aparan	Gegharot
Altitude of sites, above sea level	1860 m	2100 m
<i>Middle air temperature (°C)</i>		
January	-6/-8	-8/-10
April	(+2)+4/+6	0/+2(+4)
July	(+16)+18/+20	(+12)+14/+16
October	+8/+10	+6/+8
Sum of annual average temperatures higher than 10°C	2000-2400°	1500-2000°
Days with temperature higher than 10°C	135-150	115-135
Annual rainfalls	600-700 mm	

These two sites are situated in neighboring agro-climatic zones. At present the maturity time of cultivated cereals in Gegharot delayed with ~10 days in comparison with Aparan III site surroundings [3].

Conclusions. In general, the palaeocarpological material found in vessel from Aparan III site is common for the Early Bronze Age mountainous sites of the territory of Armenia. The cereals, particularly - two and multi-rowed hulled barleys and bread wheat with its common and club subspecies, are the only recorded cultigens in this site.

The recovered weeds are common elements of prehistoric agrophytocenoses (particularly cultivated cereals fields) of the territory of Armenia until recent times. The only essential difference from higher situated Gegharot site of the same period is larger amount of wheat (43.9%) in the cereals ratio at Aparan III, which supposedly is related with altitude of the site (1860 m above sea level) and climate (in higher territories with more severe climate the ratio of wheat is lesser, usually not more than 10%).

Acknowledgements. Sample of archaeobotanical material have been excavated and provided us by archaeologist Ruben Badalyan.

REFERENCES

1. *Badalyan R.S., Avetisyan P.S.* Bronze and Early Iron Age Archaeological Sites in Armenia. I. Mt. Aragats and its Surrounding Region. BAR International Series 1697, 2007.
2. *Hovsepyan R.* The palaeobotanical remains from Early Bronze Age Gegharot (Appendix 2). In: Badalyan R., Smith A.T., Lindsay I., Khatchadourian L., Avetisyan P., with appendices by Monahan B. and Hovsepyan R. 2009. Village, Fortress, and Town in Bronze and Iron Age Southern Caucasia: A preliminary report on the 2003-2006 investigations of Project ArAGATS on the Tsaghkahovit Plain, Republic of Armenia. Archäologische Mitteilungen aus Iran und Turan, band 40, pp. 45-105, 2009.
3. Հայաստանի ազգային ատլաս. Հատոր Ա. Երևան, Սփյուռնի Մեծ, 232 էջ, 2007:
4. *Հովսեփյան Ռ.Ա.* Դաշտային մշակաբույսերը և տարածված մոլախոտերը Հայաստանի տարածքում նոր քարի – երկաթի դարաշրջաններում: Ատենախոս. ,Բուսաբուծ. և մասնագիտ. կենսաբ. գիտ. թեկն. աստ. հայց. համար: ՀՀ ԳԼ Երկրագործ. և բույս. պաշտպ. գիտ. կենտր., Երևան, 152 էջ, 2009.
5. Атлас почв Республики Армения. Глав. ред. *Р.А. Эдилян*, Ереван, 69 с., 1990.
6. *Бадалян Р.С.* Раннебронзовое поселение Апаран III. Древнейшая культура Армении, 3. Ереван, «Мугни», с. 20-26, 2003.
7. *Тахтаджян А.Л.* Флора Армении, 1, Ереван, Изд. АН Арм.ССР, 291 с., 1954.

Received 21.04.2010



Biol. Journal of Armenia, 4 (62), 2010

INSULIN EFFECTS ON DNA INTERNUCLEOSOMAL FRAGMENTATION AND PARP-1 ACTIVITY IN RAT LIVER AND THYMUS CELL NUCLEI

A.V. MARGARYAN

*Yerevan State University, Faculty of Biology, Department of Biophysics,
E-mail: ashotmarg2004@gmail.com*

Tissue homeostasis is maintained by a dynamic balance between cell proliferation and cell death which is mainly executed in the form of apoptosis in normal physiological conditions. In this work the effect of insulin was studied, as a strong survival factor, on the internucleosomal DNA fragmentation as a widely accepted hallmark of apoptosis. The isolated rat liver and thymocyte nuclei were examined after 24 hours of *in vivo* hormone administration. Enzymatic activity changes of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) were evaluated as playing a pivotal role in apoptosis. The results obtained indicate that in 24 hours of insulin action, thymocytes revealed a delay in apoptotic DNA fragmentation. In contrast, liver nuclei displayed an increased fragmentation intensity. Insulin had a notable effect on PARP-1 only in thymocyte nuclei, where it significantly lowered the enzyme's basal activity.

Insulin – PARP-1 activity – DNA fragmentation

Հյուսվածքային հոմեոստազը պահպանվում է բջիջների աճի և մահվան դինամիկ հավասարակշռության շնորհիվ: Հայտնի է, որ բջջի ֆիզիոլոգիական մահը հիմնականում իրականանում է ապոպտիկ ճանապարհով: Ներկայացված աշխատանքում ուսումնասիրվել է գոյատևման հզոր գործոն՝ ինսուլինի, ազդեցությունը ԴՆԹ-ի ինտերնուկլեոսոմային ֆրագմենտավորման և պոլի(ԱԿՖ-ռիբոզ) պոլիմերազ-1-ի (ՊԱՌՊ-1) ակտիվության վրա, քանի որ վերջիններս ապոպտոզի բնորոշ հատկանիշներ են:

Ստացված արդյունքները ցույց են տալիս, որ ինսուլինի *in vivo* ազդեցությունից 24 ժ հետո, առնետի թիմոցիտների մեկուսացված կորիզներում ԴՆԹ-ի ապոպտիկ ֆրագմենտավորումը դանդաղում է, ի հակադրություն լյարդի կորիզների, որոնց մոտ դիտվում է ֆրագմենտավորման ինտենսիվության աճ: ՊԱՌՊ-1-ի ակտիվության վրա ինսուլինը դրսևորում է նկատելի ազդեցություն միայն թիմոցիտների կորիզներում՝ զգալիորեն իջեցնելով ֆերմենտի բազային ակտիվությունը:

Ինսուլին — ՊԱՌՊ-1-ի ակտիվություն — ԴՆԹ-ի ֆրագմենտավորում

Гомеостаз тканей осуществляется путем динамического баланса между клеточной пролиферацией и гибелью, которая в нормальных физиологических состояниях в основном протекает в форме апоптоза. В настоящей работе нами было исследовано действие инсулина, мощного фактора выживания, на интернуклеосомальную фрагментацию ДНК и активность поли(АДФ-рибоз) полимеразы-1 (ПАРП-1), которые являются основными признаками апоптоза. Наши данные показали, что *in vivo* воздействие инсулина через 24 ч приводит к замедлению интернуклеосомальной фрагментации ДНК в ядрах тимоцитов

крыс, в то время как в ядрах клеток печени наблюдается увеличение интенсивности фрагментации ДНК. Инсулин проявляет заметное воздействие на активность ПАРП-1 только в ядрах тимоцитов, значительно снижая базовую активность фермента.

Инсулин – активность ПАРП-1 – фрагментация ДНК

Tissue homeostasis is a major physiological incidence that ensures a dynamic balance between cell proliferation and cell death in the maintenance and regulation of normal tissue morphology and function. Tissue maintenance is a continuous process by which progenitor cells are recruited to differentiate into specific cell types and unwanted cells are eliminated without affecting neighboring cells. In normal physiological conditions the prevalent mode of cell death in most tissues is apoptosis which is precisely regulated by the interplay of various hormones and paracrine factors, that modulate tissue and cell-specific responses relevant to proliferation and apoptosis [1,2].

A well known endogenous factor displaying such regulatory functions is the peptide hormone insulin which plays a pivotal role in control of basic cellular processes such as carbohydrate, fat and protein metabolism. Recent studies demonstrated that in addition to its well known functions insulin can also regulate other key biological processes e.g. cell survival, apoptosis, proliferation and cell cycle [3,4]. It was shown that insulin along with insulin-like growth factor (IGF) is capable of preventing apoptosis in various cells and cell types by acting as a survival factor [5].

In last two decades it was shown that poly(ADP-ribose) (PAR) metabolism plays a vital role in a wide range of biological structures and processes, including DNA repair and maintenance of genomic stability, transcriptional regulation, apoptosis and etc. The major enzyme in PAR metabolism in the nuclei is the founding member of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) family: PARP-1. This enzyme uses NAD^+ as a substrate to perform post-translational modification of various nuclear proteins including itself. Being activated by DNA strand breaks and inhibited by ATP, PARP-1 establishes a molecular link between DNA damage, energy status and chromatin modification in cells. This enzyme also plays a key role in cell's decision to commit apoptosis by depleting its NAD^+ and ATP pools, controlling chromatin accessibility and apoptotic endonuclease activity which is required for normal nuclear degradation [6-8].

It is well known that thymus and liver though in different extent have a prominent role in formation of immunological reactions. Coming from this we were interested to study how insulin affects the basic biochemical processes that contribute to apoptosis, necrosis or cell survival. In present paper we examined DNA oligonucleosomal fragmentation and PARP-1 activity after 24 hours of insulin administration in rat liver and thymocyte nuclei.

Materials and methods. All the chemicals and reagents were purchased from Sigma. Outbred, 6 weeks old, white, male rats (120 grams weight) were used throughout experiments. Insulin was administrated peritoneal 2 units per 100 gram animal weight in water solution after 15 minutes of glucose injection (to be approx. 0.12% in blood fluid). In 24 hours of insulin injection the rats were decapitated under light ether anesthesia. Nuclei of liver and thymus cells were isolated by the method of [9]. Sucrose solutions buffered with 25 mM Tris (pH 7.5) containing 150 mM NaCl, 60 mM KCl, 15 mM spermine and 5 mM spermidine were used. DNA preparation and electrophoresis procedures were done by methods described elsewhere [10].

PARP-1 activity assay was based on chemical quantitation on NAD^+ in PARP-1 buffer [11]. The assay was modified for NAD^+ detection in isolated nuclei by us. Briefly, 2000 μl of isolated nuclear suspensions containing 1000 μg DNA were incubated with CaCl_2 , MgCl_2 (final concentrations of 1 and 6 mM respectively) and 0.5 mM NAD^+ for 10 minutes. The reaction was stopped by removal of nuclei from reaction mixture by centrifugation at 13000 g for 2 minutes.

Supernatant was aliquoted to 700 μ l in new test tubes to perform NAD^+ quantitation. NAD^+ content in aliquots was determined by sequential addition of 2 M KOH, 20% acetophenone (in EtOH) and 88% formic acid yielding final concentrations of these agents according to original assay. PARP-1 assay buffer was used as a reference containing 0.5 mM NAD^+ and all aforementioned reagents with corresponding final concentrations. NAD^+ quantity was measured by the absorbance of NAD^+ reaction product at wavelength 378 nm. The activity of PARP-1 was defined as the reduction of NAD^+ content in the samples which was determined by subtracting the absorbance of test samples from the reference.

Results and Discussion. To investigate the effects of insulin on the final “point of no return” phase of apoptosis i.e. DNA internucleosomal fragmentation, we assessed DNA cleavage in thymocyte and liver nuclei in cell free system of naked nuclei isolated from control and insulin injected animals. The results show that in control samples, oligonucleosomal DNA fragmentation in thymocyte nuclei was apparent after 6 hours of nuclei incubation in isolation media and increased further 24 hours. In contrast, isolated thymocyte nuclei from insulin treated animals revealed no DNA fragmentation after 6 hour incubation, but the intensity of fragmentation was not altered in further incubation periods (Fig. 1).

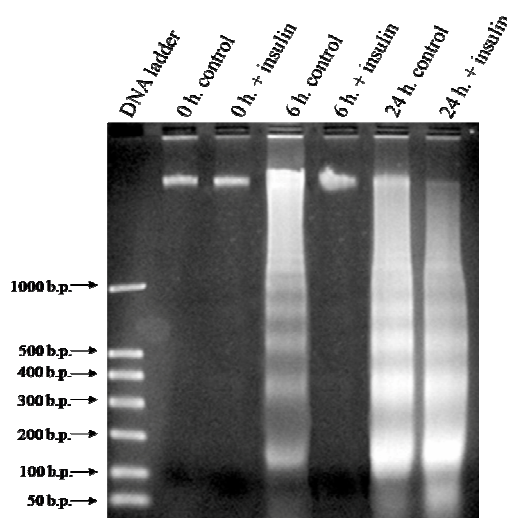


Fig. 1. DNA oligonucleosomal fragmentation in thymocyte nuclei from control and insulin treated (24 hours) animals after 0, 6 and 24 hours of incubation.

It is known that thymus expresses no insulin receptors in contrast to liver cell which are one of the main insulin target cells along with myocytes and adipocytes in the body [12]. However thymus widely displays insulin like growth factor receptors (IGFR) which have high homology with insulin receptors (IR) [13]. Recent works have shown that insulin, though with less affinity, can bind to IGFR and activate its downstream signaling cascade, which in turn results in cell proliferation, survival and activation of antiapoptotic mechanisms. Our results that show a delay in DNA internucleosomal fragmentation after insulin action are in good agreement with these data.

Effect of insulin on liver nuclei was evaluated by assessing the intensity of DNA fragmentation induced by Ca^{2+} and Mg^{2+} ions after 0 and 60 minutes of incubation with cations. Data presented in Fig. 2 shows no visible DNA degradation in the samples

derived from the nuclei immediately after isolation procedure (0 hours of incubation) from control and insulin injected animals. However, marked differences in DNA fragmentation intensity were observed in the samples incubated in the presence of divalent ions. It is obvious that insulin enhanced internucleosomal DNA fragmentation. We suppose that in liver cells that largely express IR, insulin affects metabolic pathways responsible for elevation of intracellular Ca^{2+} content which in turn, causes the activation of cation-dependent apoptotic endonucleases.

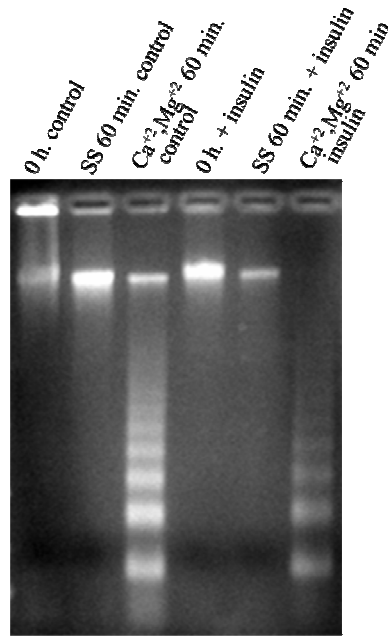


Fig. 2. DNA oligonucleosomal fragmentation in liver nuclei induced by Ca^{2+} and Mg^{2+} ions from control and insulin treated (24 hours) animals after 0 and 60 minutes of incubation.

*SS – spermine + spermidine.

To examine whether the above mentioned differences in internucleosomal DNA fragmentation had any notable impact on PARP-1, we assessed the changes of enzyme activity after 24 hours of in vivo insulin treatment. The results obtained from these experiments indicate that insulin did not affect enzyme activity in liver cell nuclei (Fig. 3).

However we observed that insulin significantly suppressed PARP-1 activity in thymocyte nuclei (Fig. 4).

It is well known that basal activity of PARP-1 strongly depends on tissue and cell context. Our data support the results of other investigators that revealed high PARP-1 activity in lymphoid organs [14]. Inactivation of PARP-1 under insulin action in thymocytes nuclei can be caused by PARP-1 dissociation from DNA [15] and may prevent intracellular NAD^+ and ATP pools depletion in thymocytes thus enhancing cell survival.

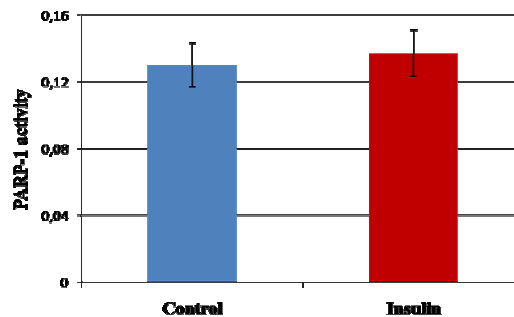


Fig. 3. PARP-1 activity (relative units) of liver nuclei of control and insulin treated animals.

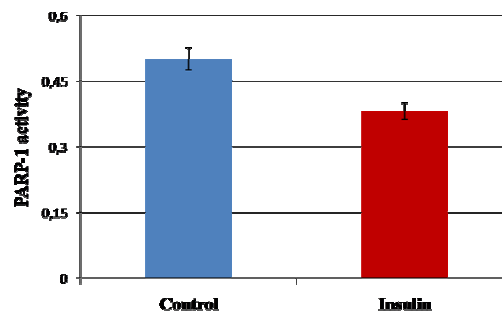


Fig. 4. PARP-1 activity (relative units) of thymocyte nuclei of control and insulin treated animals.

REFERENCES

1. Blank M. and Shiloh Y. Programs for Cell Death Apoptosis is Only One Way to Go. *Cell Cycle*, 6, pp. 686-695, 2007.
2. Taylor R.C., Cullen S.P. and Martin S.J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9, pp. 231-241, 2008.
3. Taniguchi C.M., Emanuelli B. and Kahn C.R. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7, pp. 85-96, 2006.
4. Saltiel A.R. and Kahn C.R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414, p. 799-806, 2001.
5. Freitas C.S., Dalmau S.R. and Savino W. Epidermal growth factor (EGF) modulates fetal thymocyte growth and differentiation: partial reversal by insulin, mimicking by specific inhibitors of EGF receptor tyrosine kinase activity, and differential expression of CD45 phosphatase isotypes. *The Journal of Immunology*, 161, pp. 3384-3392, 1998.
6. Huang Q. and Shen H.-M. To die or to live The dual role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in autophagy and necrosis under oxidative stress and DNA damage. *Autophagy*, 5, pp. 273-276, 2009.
7. Kirkland J.B. Poly ADP-ribose polymerase-1 and health. *Experimental Biology and Medicine*, 235, pp. 561-568, 2010.
8. Krishnakumar R. and Kraus W.L. The PARP Side of the Nucleus: Molecular Actions, Physiological Outcomes, and Clinical Targets. *Molecular Cell*, 39, pp. 8-24, 2010.

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. *Biochem Biophys Res Commun*, 52, pp. 475–481, 1973.
10. Artsruni I., Matinyan K., Melnikova-Sharova M. and Gevorgyan E. Spontaneous internucleosomal DNA fragmentation in isolated nuclei. *Electronic Journal of Natural Sciences*, 1, pp. 13-17, 2008.
11. Putt K.S. and Hergenrother P.J. An enzymatic assay for poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) via the chemical quantitation of NAD⁺: application to the high-throughput screening of small molecules as potential inhibitors. *Analytical Biochemistry*, 326, pp. 78-86, 2004.
12. Savino W. and Dardenne M. Neuroendocrine Control of Thymus Physiology. *Endocrine Reviews*, 21, pp. 412-443, 2000.
13. Chitnis M.M., Yuen J.S.P., Protheroe A.S., Pollak, M. and Macaulay V.M. The Type 1 Insulin-Like Growth Factor Receptor Pathway. *Clin Cancer Res*, 14, pp. 6364-6370, 2008.
14. Ha H.C. and Snyder S.H. Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, u vol. 9613978–13982, 1999
15. Kim M.Y., Mauro S., Gevry N., Lis J.T. and Kraus W.L. NAD⁺-Dependent Modulation of Chromatin Structure and Transcription by Nucleosome Binding Properties of PARP-1. *Cell*, 119, pp. 803–814, 2004.

Received 10.09.2010



Биол. журн. Армении, 4 (62), 2010

ЗАВИСИМОСТЬ АКТИВНОСТИ ПАРП-1 И ИНТЕНСИВНОСТИ ИНТЕРНУКЛЕОСОМАЛЬНОГО РАСЩЕПЛЕНИЯ ХРОМАТИНА ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ АТФ В ЯДРАХ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ КРЫС

М.А. МЕЛЬНИКОВА-ШАРОВА

Ереванский госуниверситет, биологический факультет, кафедра биофизики
E-mail: melnikova.sharova@ysu.am

Исследовано действие АТФ на активность поли(АДФ-рибозил)полимеразы-1 (ПАРП-1) и интенсивность интернуклеосомального расщепления хроматина изолированных ядер клеток печени крыс.

Показано, что при инкубации изолированных ядер клеток печени в среде, содержащей АТФ, резко понижается как интенсивность интернуклеосомального расщепления хроматина, так и активность ядерной ПАРП-1. Повышение содержания АТФ в среде инкубации изолированных ядер до количеств, соответствующих максимальным физиологическим значениям, практически полностью подавляет не только активность ПАРП-1, но и интернуклеосомальную фрагментацию хроматина.

Полученные данные позволяют предположить, что АТФ может быть задействован в процессах ремоделирования хроматина посредством регулирования активности хроматин-ассоциированного фермента ПАРП-1.

Клеточное ядро – ДНК – ПАРП-1 – АТФ

Ուսումնասիրվել է ԱԵՖ-ի ազդեցությունը պոլի(ԱԿՖ-ռիբոզիլ)պոլիմերազ-1-ի (ՊԱՌՊ-1) ակտիվության և քրոմատինի ինտերնուկլեոսոմային ձեռքավորման ինտենսիվության վրա:

Ցույց է տրվել, որ թե՛ քրոմատինի ինտերնուկլեոսոմային ձեռքավորման ինտենսիվությունը, թե՛ ՊԱՌՊ-1-ի ակտիվությունը նվազում են, երբ կորիզներն ինկուբացվում են ԱԵՖ-ի ներկայությամբ: ԱԵՖ-ի քանակի ավելացումն ինկուբացիոն միջավայրում մինչև մաքսիմալ ֆիզիոլոգիական քանակները, գրեթե լիովին ճնշում է ոչ միայն ՊԱՌՊ-1-ի ակտիվությունը, այլ նաև քրոմատինի ինտերնուկլեոսոմային ձեռքավորումը:

Ստացված տվյալները թույլ են տալիս ենթադրել, որ ԱԵՖ-ը կարող է մասնակցել քրոմատինի ռեմոդելավորման գործընթացին, կարգավորելով ՊԱՌՊ-1-ի ակտիվությունը:

Բջջակորիզ – ԴՆԹ – ՊԱՌՊ-1 – ԱԵՖ

The effect of ATP on activity of poly (ADP-ribose) polymerase-1 in isolated rat liver nuclei and the intensity of internucleosomal chromatin fragmentation were studied.

It was shown that addition of ATP into nuclei incubation media dramatically suppressed the internucleosomal DNA fragmentation and inhibited the activity of nuclear PARP-1. Elevation of ATP content in the incubation medium of isolated nuclei up to maximal physiological values nearly completely suppressed both of PARP-1 activity and internucleosomal fragmentation of chromatin.

These data suggest that ATP may be involved in the processes of chromatin remodeling by regulating the activity of chromatin-associated enzyme PARP-1.

CELL Nuclei – DNA – PARP-1 – ATP

PARP-1(поли(АДФ-рибозил)полимераза) является ядерным ферментом с молекулярной массой 116 кДа. Связываясь с молекулами ДНК в линкерных участках Zp –фингерными доменами, PARP-1 активируется и катализирует расщепление НАД⁺ на никотинамид и АДФ-рибозу. Присоединяя молекулы АДФ-рибозы к белкам-мишеням, PARP-1 синтезирует линейные и разветвленные полимеры поли(АДФрибозы).

PARP-1 считается одним из важнейших ферментов, контролирующих локальные изменения пространственной организации хроматина и доступность последнего для различных факторов, определяющих те или иные функции. Тем самым PARP-1 играет значительную роль в биологических процессах, определяющих как успешное выживание клеток, так и их гибель. В частности полагается, что гиперактивация PARP-1 является причиной некротической гибели клеток, вследствие истощения клеточного содержания АТФ. Однако прямые доказательства того, что уменьшение внутриклеточного содержания АТФ является следствием, а не причиной избыточной активации PARP-1, отсутствуют.

Значение АТФ в данном контексте возросло после того, как обнаружилось, что АТФ является аллостерическим ингибитором PARP-1 *in vitro* [4, 7]. Отметим, что PARP-1 является уникальным ферментом, который, не имея протомерных субъединиц, имеет систему аллостерического регулирования. Эта уникальность обусловлена специфической доменной структурой фермента. АТФ осуществляет аллостерическое ингибирование, благодаря тому что почти полностью подавляет аутополи(АДФ-рибоз)илирование PARP-1, при этом не действуя на способность PARP-1 к трансполи(АДФ-рибоз)илированию [6].

Исходя из вышесказанного, мы предположили, что подавление аутополи(АДФ-рибоз)илирования АТФ будет препятствовать процессу отделения молекулы фермента от ДНК, тем самым уменьшая доступность линкерных участков хроматина для внутриядерных эндонуклеаз.

С целью изучения данного вопроса мы исследовали динамику интернуклеосомального расщепления хроматина в ядрах клеток печени крыс в присутствии различных физиологических концентраций АТФ и коррелятивного изменения активности PARP-1 в изолированных ядрах клеток печени крыс (*ex vivo*).

Материал и методика. В работе использованы реактивы фирмы Sigma (США). В качестве экспериментальных животных служили белые беспородные крысы массой 100-120 г. Выделение ядер производили по методу [3]. В качестве стабилизаторов ядерных структур и хроматина в среду выделения ядер добавляли полиамины и хлориды калия и натрия. Среда выделения содержала 0,25 М сахарозу; 0,15 мМ спермин; 0,5 мМ спермидин; 60 мМ KCl; 15 мМ NaCl; 25 мМ Трис pH 7,4.

Плотность ядерной суспензии в исследуемых образцах стандартизировали по оптической плотности проб, растворенных в 0,1 N растворе NaOH. Оптическая плотность ядерной суспензии приводилась в соответствие с поглощением 1мг/мл ДНК.

Для инициации интернуклеосомального расщепления ДНК ядер в среду их инкубации добавляли растворы CaCl₂ и MgCl₂ с тем, чтобы конечная концентрация двухвалентных ионов кальция и магния составляла 1 и 6 мМ соответственно. ДНК выделяли из суспензии ядер по ранее описанной методике [1]. Электрофоретические полосы ДНК выявляли после окраски гелей бромидом этидия.

Для определения относительного содержания ДНК в отдельных электрофоретических полосах была использована специальная компьютерная программа денситометрирования (FUJIFILM, Science lab, Image Gauge V 0.4), разработанная для оценки цифровых фотографий гелей.

Активность ПАРП-1 определяли по модифицированному методу [8]. Метод основан на колориметрическом определении окрашенного продукта реакции НАД⁺ с ацетофеноном (поглощение при длине волны, равной 378 нм). Реакционная среда содержала 2 мл ядерной суспензии в среде выделения, в которую добавляли маточные растворы CaCl₂, MgCl₂ и НАД⁺ с тем, чтобы конечные концентрации указанных веществ составляли 1мМ, 6 мМ, и 0,5 мМ соответственно. АТФ добавляли в реакционную среду так, чтобы конечные концентрации составляли 1мМ, 5 мМ и 10 мМ в конечном объеме 2,5 мл.

Через 8 мин после инициации реакции ядра осаждали из реакционной среды центрифугированием (2 мин 8000 g). Количество остаточного НАД⁺ определяли в аликвотах надосадочной жидкости (700 мкл) последовательным добавлением КОН, ацетофенона и муравьиной кислоты. Конечные концентрации реактивов в реакционной среде составляли 222 мМ, 2,2 % и 44 % соответственно. Стандартный образец содержал все составляющие реакционной среды ПАРП-1 (CaCl₂, MgCl₂ и НАД⁺), за исключением ядерной суспензии. Активность ПАРП-1 определяли количеством НАД⁺, утилизированного ядрами в течение 10 мин [5].

Результаты и обсуждение. Согласно полученным нами данным, АТФ подавляет активность ПАРП-1 в изолированных ядрах (рис 1).

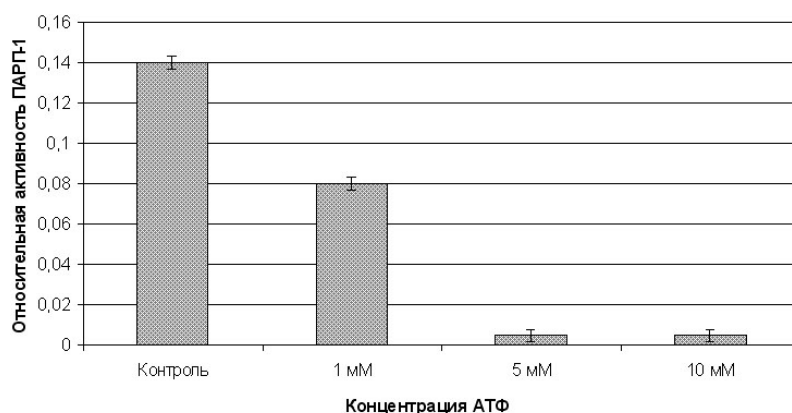


Рис. 1. Действие различных концентраций АТФ (1 мМ; 5 мМ; 10 мМ) на активность ПАРП-1 в изолированных ядрах печени крыс.

Ранее была отмечена зависимость апоптоза от АТФ [2]. Известно, что апоптоз является активным энергозависимым процессом. Отсутствие АТФ или его нехватка в клетке приводит к переключению апоптической программы элиминации клеток на некротическую. Было высказано предположение о том, что АТФ обеспечивает нарастающий приток ионов Ca²⁺ в ядро, что необходимо для активации Ca²⁺/Mg²⁺-зависимой эндонуклеазы и тем самым для успешного завершения “исполнительской” фазы апоптоза.

Электрофоретическим разделением ДНК ядер клеток печени и последующим цифровым денситометрированием соответствующих электрофореграмм нам удалось установить, что АТФ действует на интенсивность фрагментирования ДНК в изолированных ядрах печени. Как выяснилось, присутствие 1мМ АТФ в среде инкубации ядер клеток печени крыс угнетает интернуклеосомальное фрагментирование ДНК. Нами было показано, что наличие в среде более высокой концентрации АТФ (5 мМ) полностью подавляет фрагментацию ДНК Ca²⁺/Mg²⁺-зависимой эндонуклеазой, что видно из соответствующей электрофореграммы (рис. 2) и диаграммы количественного анализа цифровых денситограмм (рис. 3).

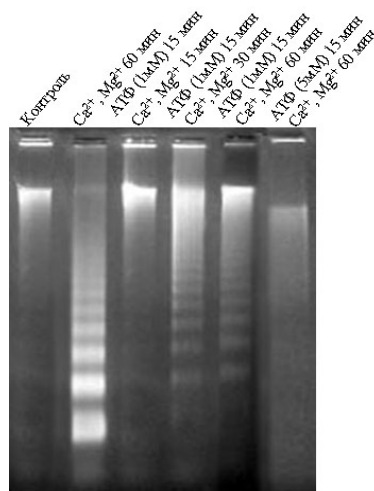


Рис. 2. Действие АТФ (1 мМ, 5 мМ) на процесс интернуклеосомального расщепления хроматина в ядрах клеток печени крыс, инкубированных в присутствии ионов Ca^{2+} , Mg^{2+} .

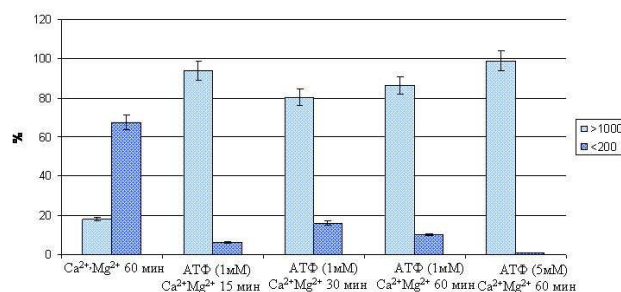


Рис. 3. Сравнение процентного содержания высокополимерных и низкополимерных фрагментов ДНК после инкубации ядер в присутствии АТФ (1 и 5 мМ).

Полученные нами результаты хорошо согласуются с литературными данными, указывающими на ингибцию микрококковой эндонуклеазы АТФ в системе с искусственно сконструированным хроматином. Известно, что зонами атаки этого фермента, как и $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -зависимой эндонуклеазы, являются линкерные или интернуклеосомальные участки хроматина. Авторами этой работы было высказано предположение, что связывание АТФ в домене ауторибозилирования ПАРП-1 способствует укреплению связи ДНК – фермент, экранируя и тем самым уменьшая доступность линкерных участков для эндонуклеазы [4]. Таким образом, данные, полученные нами при исследовании действия АТФ на процесс интернуклеосомального расщепления хроматина в ядрах клеток печени крыс, подтверждают гипотезу, высказанную указанными авторами, исследовавшими влияние АТФ на процесс интернуклеосомального расщепления ДНК в модельных системах *in vitro*.

Поскольку поли(АДФ-рибозил)ирование $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -зависимой эндонуклеазы, осуществляемое ПАРП-1, подавляет активность фермента [9], мы предположили, что эффективность АТФ, как ингибитора процесса интернуклеосомального фрагментирования, резко возрастет, если нам удастся увеличить транскрибирующую

активность внутриядерной ПАРП-1. Для этого в среду инкубации изолированных ядер печени вместе с 1мМ АТФ мы добавили 0,5 мМ НАД⁺. Результаты этих опытов подтвердили правоту сделанного предположения, так как в присутствии НАД⁺ 1мМ АТФ полностью подавляет интернуклеосомальное расщепление внутриядерной ДНК (Рис. 4).

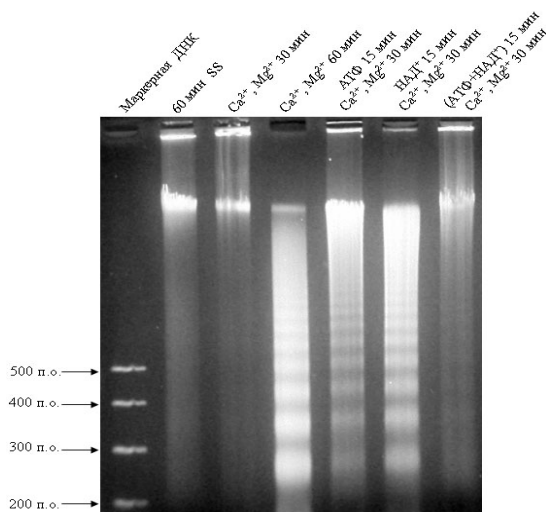


Рис. 4. Совместное действие НАД⁺ и АТФ на интернуклеосомальную фрагментацию ДНК (НАД⁺ 0,5мМ, АТФ 1 мМ).

Ингибируя аутополи(АДФ-рибозил)ирование ПАРП-1 в изолированных ядрах печени крыс, АТФ значительно снижает интенсивность интернуклеосомального фрагментирования, что свидетельствует об уменьшении доступности хроматина для эндонуклеаз. На основании этих данных можно предположить, что истощение содержания АТФ в цитоплазме клеток может инициировать интернуклеосомальное расщепление хроматина, вследствие активации ауторибозилирования ПАРП-1 и связанного с этим увеличения доступности хроматина для эндонуклеаз.

В настоящее время все больше исследователей склоняются к тому, что строгое разграничение апоптической и некротической форм клеточной смерти является условным, поскольку на один и тот же стимул клетки могут реагировать различной формой гибели в зависимости от силы, длительности воздействия или энергетического статуса клеток [10]. В целом, полученные нами данные указывают на то, что ПАРП-1 может являться тем посредником, который согласует процесс внутриядерной деструкции с энергетическим статусом клетки, не ограничивая значение АТФ и НАД⁺ их сугубо энергетической ролью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Artsruni I.G., Matinyan K.S., Melnikova-Sharova M.A., Gevorgyan E.S. Spontaneous internucleosomal DNA fragmentation in isolated nuclei. *Electronic Journal of Natural Sciences*, 1, 10, pp. 13-17, 2008.
2. Dean P. Jones, David J. McConkey, Pierluigi Nicotera, and Sten Orrenius. Calcium-activated DNA Fragmentation in Rat Liver Nuclei. *The Journal of Biological Chemistry*, 264, 11, pp. 6398-6403, 1989.

3. 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.
4. Kim M.Y., Mauro S., Ge'vry N., Lis J.T., Kraus L.W. NAD⁺-dependent modulation of chromatin structure and transcription by nucleosome binding properties of PARP-1. *Cell*, 119, 6, pp. 803-814, 2004.
5. Kirsten E., Jackowski G., McLick J., Hakam A., Decker K., Kun E. Cellular regulation of poly(ADP) ribosylation of proteins. I. Comparison of hepatocytes, cultured cells and liver nuclei and the influence of varying concentrations of NAD. *Exp. Cell Res.*, 161, 41-52, 1985.
6. Kun E., Kirsten E., Mendeleyev J., Ordahl C.P. Regulation of the enzymatic catalysis of poly(ADP-ribose) polymerase by dsDNA, polyamines, Mg²⁺, Ca²⁺, histones H1 and H3 and ATP. *Biochemistry*. 45, 3, pp. 210-216, 2004.
7. Kun E., Kirsten E., Hakam A., Bauer P., Mendeleyev J. Identification of poly(ADP-ribose) polymerase-1 as the OXPHOS-generated ATP sensor of nuclei of animal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 366, 568-573, 2008.
8. Putt K.S., Hergenrother P.J. An enzymatic assay for poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) via the chemical quantitation of NA^{D+}: application to the highthroughput screening of small molecules as potential inhibitors. *Analytical Biochemistry*, 326, pp. 78-86, 2004.
9. Yakovlev A.G., Wang G., Stoica B. A., Boulares H.A., Spoonde A.Y., Yoshihara K., Smulson M.E. A Role of the Ca²⁺/Mg²⁺-dependent Endonuclease in Apoptosis and Its Inhibition by Poly(ADP-ribose) Polymerase. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 28, pp. 21302-21308, 2000.
10. Zong W.-X., Ditsworth D., Bauer D.E, Wang Z.-Qi and Thompson C. B. Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. *Genes & Dev.* 18, 1272-1282; 2004.

Поступила 10.09.2010



Биолог. журн. Армении, 4 (62), 2010

РОЛЬ АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ В РЕГУЛЯЦИИ ТЕМПЕРАТУРНОГО ГОМЕОСТАЗА У КРЫС ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ДИАБЕФИТА

Р.А. АРУТЮНЯН, Х.О. НАГАПЕТЯН, А.М. БАБАХАНИЯ,
Л.Э. ОГАНЕСЯН

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

Показано, что сбор лекарственных растений диабифит участвует в регуляции температурного гомеостаза организма посредством адренорецепторов симпатической нервной системы. Блокада последних снижает его активирующее влияние как на физические, так и на химические терморегулирующие механизмы организма.

Температура – гомеостаз – диабифит – адренорецепторы

Բացահայտվել է, որ դեղաբույսերի հավաքածու դիաբեֆիտը օրգանիզմի սիմպատիկ նյարդային համակարգի ադրենալնկալիչների միջոցով մասնակցում է օրգանիզմի ջերմային հոմեոստազի կարգավորմանը: Վերջիններիս շրջափակումը թուլացնում է նրա ակտիվացնող ազդեցությունը օրգանիզմի ինչպես ֆիզիկական, այնպես նաև քիմիական ջերմակարգավորման մեխանիզմների վրա:

Ջերմաստիճան - հոմեոստազ - դիաբեֆիտ - ադրենալնկալիչ

It has been established that the collection of medicinal plants diabefit participates in regulation of temperature homeostasis of organism via adrenoreceptors of sympathetic nervous system. The blockage of adrenoreceptors reduced its activating influence on both physical and chemical thermoregulating mechanisms of organism.

Temperature – homeostasis – diabephite - adrenoreceptors

В настоящее время в медицинской практике достаточно широко применяются фитопрепараты как возбуждающие средства при угнетении центральной нервной системы, ослаблении функции дыхания, функциональных нарушениях сердечно-сосудистой системы, а также как укрепляющие организм средства [2,5,7,9].

В опытах [3] было установлено, что базилик лимонный (*Ocimum basilicum* L.) и переступень белый (*Brionia alba* L.) обладают антистрессорными свойствами и способствуют сохранению температурного гомеостаза организма при стрессовых ситуациях.

Одним из малоизученных фитопрепаратов является сбор лекарственных растений - диабифит, богатый белками, йодом, витаминами, микроэлементами и другими биологически активными веществами [1].

Настоящая работа посвящена изучению влияния растительного лекарственного сбора диабифит на химические и физические механизмы регуляции температурного гомеостаза организма крыс до и после блокады адренэргических структур симпатической нервной системы.

Материал и методика. Исследования велись на 9 белых нелинейных крысах-самцах со средней массой 270 г в хроническом эксперименте, в трех сериях – по 3 животных в каждой. Крысы всех серий содержались в одинаковых условиях ухода и кормления. Крысы первой серии, которые для питья получали 10%-ный водный настой диабифита, служили контролем. Крысы второй серий получали диабифит тем же путем на фоне блокады бета-адренорецепторов обзиданом в дозе 0,1 мл/100 г массы тела, а крысы третьей серии – диабифит на фоне блокады альфа адренорецепторов фенталамином в дозе 0,1 мл/100 г массы тела. Всего было проведено 30 опытов, при средней температуре экспериментальной камеры 14,5°C.

После регистрации исходных терморегуляторных показателей их регистрирование продолжалось в течение 1,5 ч с 30-минутными интервалами на фоне блокады адренорецепторов.

В опытах учитывали несократительный термогенез, сократительный термогенез и температуру периферических сосудов, а также определяли теплоотдачу и теплосодержание в организме.

Для определения активности несократительного термогенеза “рабочие” спай медно-константановой термопары вводили в ободочную кишку на глубину 5-6 см, а для регистрации активности сократительного термогенеза спай термопар с помощью инъекционной иглы вводили в мякоть бедренных мышц на глубину 1,5-2 см.

Температуру периферических кровеносных сосудов измеряли с поверхности хвостовой артерии, которая у крыс является хорошим теплообменником между организмом и внешней средой. Регистрацию температурных показателей проводили 12-точечным потенциометром типа ЭПП-09МЗ, подключенным к выходу фотоэлектрического усилителя типа Ф-16/2 с чувствительностью 0,013°C.

Теплоотдачу, осуществляемую радиационно-конвекционным путем, определяли по формуле [4]

$$H_{гк} = m.c.(T_{я} - T_{к}),$$

где $H_{гк}$ – показатель радиационно-конвекционной теплоотдачи в калориях на 100 г массы тела животного; m – масса крови, равная 7,3% от массы тела, c – удельная теплоемкость крови, равная 0,93 кал/г °C, $T_{я}$ и $T_{к}$ – соответственно температура “ядра” (ободочной кишки) и периферических сосудов кожи.

Теплосодержание в калориях на 100 г массы животного определяли по формуле [5]

$$Q = m.c.^{\circ}t,$$

где m – масса животного; c – средняя теплоемкость тела, равная 0,83 кал/г °C.,

$^{\circ}t$ – средняя температура “ядра” организма.

Результаты и обсуждение. Результаты экспериментов, представленные в табл. 1, показывают, что у крыс, получавших диабифит, резко активируются как несократительный, так и сократительный термогенез, наблюдается хорошо выраженный гипертермический эффект: температура желудочно-кишечного тракта от 35,46°C повышается до 36,03°C ($\Delta^{\circ}t$ составляло 0,57°C), а температура скелетных мышц повышается от 33,82°C до 34,68°C, или на 0,86 °C.

Данные табл.1 показывают, что диабифит вызывает вазодилатацию и повышает температуру периферических артериальных сосудов в пределах 1,29-1,43 °C, или от 22,59°C до 24,02°C.

Что касается изменения теплоотдачи и теплосодержания в организме контрольных крыс, то из данных табл. 1 видно, что диабифит у этих крыс снижал теплоотдачу в первые 30 мин в пределах 9,0 кал/100 г, а через 90 мин в пределах 2,54 кал/100 г или от 87,00 до 84,46 кал/100 г массы тела.

Теплосодержание во время действия диабифита в организме контрольных крыс увеличивалось от 2943 кал/100 г до 2990 кал/100 г или ΔQ составлял 47,0 кал/100 г.

Таблица 1. Роль адренорецепторов в регуляции температурного гомеостаза у крыс под воздействием диабефита

Исследуемый орган	Возд-ий фактор	Температура °C			
Ободочная кишка	Диабефит	35,46	35,52 ($\Delta t+0,06$)	35,84 ($\Delta t+0,38$)	36,03($\Delta t+0,57$)
	Диабефит+ обзидан	35,89	35,79 ($\Delta t-0,01$)	35,86($\Delta t-0,03$)	35,90($\Delta t+0,01$)
	Диабефит+ фенталамин	36,45	36,11($\Delta t-0,34$)	35,80($\Delta t-0,65$)	35,41($\Delta t-1,04$)
Скелетные мышцы	Диабефит	33,82	33,94($\Delta t+0,12$)	34,04($\Delta t+0,22$)	34,68($\Delta t+0,86$)
	Диабефит+ обзидан	33,87	33,91($\Delta t+0,04$)	33,74($\Delta t-0,13$)	33,63($\Delta t-0,24$)
	Диабефит+ фенталамин	34,03	34,03($\Delta t \pm 0,00$)	33,63 ($\Delta t-0,48$)	33,49($\Delta t-054$)
Подкожные сосуды	Диабефит	22,59	24,02($\Delta t+1,43$)	22,95($\Delta t+0,36$)	23,88($\Delta t+1,29$)
	Диабефит+ обзидан	21,80	22,18($\Delta t+0,38$)	22,44($\Delta t+0,64$)	22,80($\Delta t+1,00$)
	Диабефит+ фенталамин	22,44	24,00($\Delta t +1,56$)	22,49 ($\Delta t+0,05$)	22,93($\Delta t+0,49$)
Теплоотдача, кал/100 г	Диабефит	87,00	78,00($\Delta Q-9,00$)	87,5 ($\Delta Q+0,50$)	84,46($\Delta Q-2,54$)
	Диабефит+ обзидан	95,00	92,37($\Delta Q-2,63$)	104,6($\Delta Q+9,60$)	89,70($\Delta Q-5,30$)
	Диабефит+ фенталамин	95,10	82,20($\Delta Q-12,90$)	97,12($\Delta Q+2,02$)	84,70($\Delta Q-10,40$)
Теплосодержание, кал/100 г	Диабефит	2943	2948($\Delta Q+5,00$)	2975 ($\Delta Q+32,0$)	2990($\Delta Q+47,00$)
	Диабефит+ обзидан	2979	2970($\Delta Q-9,00$)	2976 ($\Delta Q-3,00$)	2988($\Delta Q+9,00$)
	Диабефит+ фенталамин	3025	2997($\Delta Q-28,00$)	2971($\Delta Q-54,00$)	2939($\Delta Q-86,00$)

Результаты экспериментов, полученные на крысах второй серии опытов, показывают, что на фоне блокады бета-адренорецепторов диабефит снижает активность как несократительных, так и сократительных механизмов химической терморегуляции. Действительно, из данных табл.1, видно, что через 30 мин после блокады бета-адренорецепторов температура желудочно-кишечного тракта под воздействием диабефита у животных от 35,89°C снижалась до 35,79°C, или в пределах 0,10°C. В дальнейшем активность несократительного термогенеза повышалась и температура ободочной кишки через 90 мин достигала исходного уровня и составляла 35,90°C.

Что касается механизмов сократительного термогенеза и сосудистой терморегуляторной реакции, то согласно данным табл.1, диабефит на фоне блокады бета-адренорецепторов снижает температуру скелетных мышц в пределах 0,24°C или от 33,87°C до 33,63°C и вызывает вазодилатацию, повышая температуру артериальных кровеносных сосудов кожи в пределах 1,0°C, или от 21,8°C до 22,8°C.

Изучение действия диабефита на механизмы теплоотдачи и теплосодержания на фоне блокады бета-адренорецепторов симпатической нервной системы показало, что диабефит в этих условиях снижает теплоотдачу в пределах 5,3 кал/100 г или от 95,0 до 89,7 кал/100 г массы тела, а теплосодержание повышает в пределах 9,0 кал/100 г или от 2979 до 2988 кал/100 г массы тела.

Результаты экспериментов, проведенных на крысах 3-й серии, показывают, что действие диабефита на физико-химические механизмы терморегуляции осуществляется и через альфа-адренергические структуры симпатической нервной системы. Действительно, из данных табл.1 видно, что при введении крысам диабефита на фоне блокады альфа-адренорецепторов активность как несократительного, так и сократительного термогенеза снижается значительно сильнее, чем диабефита на фоне блокады бета-адренорецепторов. Так, температура ободочной кишки на фоне блокады альфа-адренорецепторов снижалась на 1,04°C, или от

36,45°C до 35,41°C. Температура скелетных мышц в аналогичных условиях снижается на 0,54°C, или от 34,03°C до 33,49°C.

Что касается динамики изменения температуры периферических сосудов, то диабетит на фоне блокады альфа-адренорецепторов в первые 30 мин вызывает вазодилатацию и повышает температуру этих сосудов в пределах 1,56°C или от 22,44°C до 24,00°C. В дальнейшем происходит слабая вазодилатация, и температура сосудов через 90 мин действия диабетита повышалась всего на 0,49°C или от 22,44°C до 22,93°C.

Данные таблицы показывают, что в результате слабой вазодилатации теплоотдача через кожные сосуды снижается в пределах 0,4-12,9 кал/100 г или от 95,1 до 82,2 кал/100 г массы тела. Что касается изменения теплосодержания, то оно снижается в пределах 86,0 кал/100 г, или от 3025 до 2939 кал/100 г массы тела.

Из анализа полученных данных можно заключить, что диабетит участвует в регуляции температурного гомеостаза организма через адренорецепторы симпатической нервной системы. Блокада последних снижает активность как физических, так и химических терморегулирующих механизмов организма.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Բարսիսյան Մ.Ա., Դովիանյանսյան Լ.Է, Մարգենկո Չ.Ի.* Յոդի անբավարարության խնդիրները ԼՂՀ-ում և նրա հետազոտող համալրումը ավանդական ու ժամանակակից մեթոդներով: ՀՀ գյուղ. նախ. Ազրոգիտություն, Երևան, 5-6, էջ 207-211, 2008.
2. *Հարությունյան Լ.Վ. Հարությունյան Ա.Վ.* Ֆիտոթերապիա Երևան, Հայաստան, 4, էջ 131-143, 2001.
3. *Соколов С. Я., Замотаев И.К.* Справочник по лекарственным растениям (фитотерапия). М., “Медицина”, 443 с., 1984.
4. *Мяткова В.Д., Степанов Ю.С.* Применение базилика лимонного при заболеваниях органов дыхания. Ж. “Здоровье”, 1, с. 23-26, 2004.
5. *Матинян Л.А., Марченко З.И., Нагапетян Х.О. и др.* Влияние базилика лимонного на вызванную активность одиночных пирамидных нейронов коры головного мозга крыс в норме и при гипотиреозе. Вестник МАНЭБ, 13, вып.1, с.183-186, 2008.
6. *Нагапетян Х.О., Арутюнян Р.А., Бабаханян М.А. и др.* Влияние базилика лимонного (*Ocimum basilicum* L) на регуляцию температурного гомеостаза организма крыс. Биолог. журн.. Армении, 62, 1, с.47-50, 2010.
7. *Антонян М.В., Арутюнян Р.А., Нагапетян Х.О., Мартirosян С.Ш.* Влияние переступня белого на регуляцию температурного гомеостаза крыс при стрессе. Биолог. журн. Армении, 60, 1-2, с.8-13, 2008.
8. *Иванов К.П.* Физиология терморегуляции, Л., “Наука”, 469 с., 1984.
9. *Майстах Е.В.* В кн. Физиология терморегуляции, Л-д, “Наука”, 469 с., 1984.

Поступила 31.08.2010.



Биол. журн. Армении, 4 (62), 2010

О НЕКОТОРЫХ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ОСОБЕННОСТЯХ ТИМУСА ПТИЦ

Г.Ю. ПОГОСЯН, К.А. ДЖИВАНЯН

Ереванский госуниверситет, биологический факультет, кафедра зоологии
kjivanian@ysu.am

С применением общегистологических, ферментохимических и гистохимических методик описаны некоторые морфофункциональные особенности тимуса домашних кур. Описаны цитоархитектоника эпителиального ретикулума, распределение в коре и мозговом веществе органа лимфоцитов разного уровня дифференцировки, особенности цист и телец Гассала, выявлены также два вида макрофагов. Описаны также тучные клетки тимуса цыплят и особенности их локализации в органе.

Тимус - цыплята

Շնորհանուր հյուսվածաբանական, ֆերմենտաքիմիական և հիստոքիմիական մեթոդների կիրառմամբ նկարագրվում են տնային հավերի ուրցագեղձի մորֆոֆունկցիոնալ որոշ առանձնահատկություններ: Նկարագրվում են էպիթելային ցանցի տարածական կառուցվածքը, տարբերակման տարբեր մակարդակներում գտնվող լիմֆոցիտների տարաբաշխումը օրգանի կեղևում և միջուկում, ցիստերի և Հասսալի մարմնիկների առանձնահատկությունները, հայտնաբերվել են նաև մակրոֆագերի երկու տեսակ: Նկարագրվում են նաև ճտերի ուրցագեղձի պարարտ բջիջները և օրգանում նրանց տեղակայման առանձնահատկությունները:

Ուրցագեղձ - ճտեր

Some morphofunctional features of house hens's thymus are described by application of general histological, enzymatic-chemical and histochemical techniques. Epithelial reticulum cytoarchitectonics, distribution of cortical and medullary different level differentiation's lymphocytes, cystes's and Hassall's corpuscles's features are also described. Two kinds of macrophages are revealed. Mastocytes and their localisation features in thymus are also described.

Thymus – chickens

Тимус птиц, также как у других высших позвоночных животных, является центральным органом системы иммунитета, где размножаются Т-лимфоциты и происходит их селекция. Вопросы особенностей строения данного органа птиц привлекают внимание многих исследователей [1-4]. Можно утверждать, что после тимуса млекопитающих, тимус птиц наиболее изученный среди всех позвоночных животных. В нашу задачу входило получение дополнительных данных о морфофункциональных особенностях тимуса птиц путем привлечения методов ферментохимического анализа, а также гистохимических методов выявления тучных клеток и импрегнации серебром.

Материал и методика. Материалом для работы послужили образцы тимуса 2-месячных цыплят, массой 300–400 г. Для взятия материала цыплят умерщвляли под глубоким наркозом. Кусочки тимуса фиксировали в жидкостях Буэна и Карнуа и подвергали обычной гистологической обработке. Одновременно, в целях выявления активности ферментов, были получены свежемороженые криостатные срезы. Парафиновые срезы толщиной в 5–6 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван Гизону, толудиновой синью и импрегнировали серебром по Футу. На криостатных срезах толщиной в 10 мкм выявляли активность сукцинатдегидрогеназы, кислой фосфатазы и неспецифических эстераз. Активность сукцинатдегидрогеназы выявляли методом Нахласа и соавт., основанном на использовании в качестве субстрата нитро-Ст. Срезы инкубировали в течение 2-х ч в растворе субстрата при температуре 37°C. После завершения инкубации срезы промывали в физиологическом растворе, фиксировали в 10%-ном формалине и заключали в смесь глицерин – желатина. Активность кислой фосфатазы выявляли методом азосочетания с использованием AS-нафтолов. Срезы инкубировали в смеси, содержащей фосфат нафтола AS-BI и диазоновую соль – прочный синий PP. Срезы инкубировали в течение 3-х ч при температуре 37°C, далее промывали в дистиллированной воде и заключали в смесь глицерин – желатина. На структурах, обладающих активностью фермента, выпадал осадок азокрасителя, цвет которого (от серого до сине-черного) зависел от степени активности фермента. Активность неспецифических эстераз выявляли методом Гомори, используя в качестве субстрата α -нафтилацетат. Инкубация продолжалась в течение 30 мин при комнатной температуре. Далее срезы промывали в дистиллированной воде и заключали в смесь глицерина и желатина. Продукт активности фермента выпадал на реагирующих структурах в виде зерен от голубого до сине-черного цвета.

Результаты и обсуждение. Тимус домашних кур состоит из 6–8 пар яйцевидных, уплощенных долей, расположенных вдоль шеи в подкожной соединительной ткани. Снаружи орган покрыт капсулой, которая состоит из плотной соединительной ткани. Капсула его содержит грубые пучки коллагеновых волокон и соединительнотканые клетки. По капсуле внутрь органа заходят кровеносные сосуды. Капсула, также как в тимусе млекопитающих, подстлана слоем ретикулоэпителиоцитов. При импрегнации серебром отчетливо выявляется базальная мембрана, которая служит границей между капсулой и эпителиальными клетками. От капсулы в паренхиму отходят септы, разделяющие орган на доли и дольки, которые между собой полностью не разъединены. В септах имеются коллагеновые и ретикулярные волокна. По этим прослойкам и по капсуле проходят артерии и вены.

В тимусе цыплят хорошо выделяются корковая и мозговая части.

Помимо септ, в корковом веществе на препаратах, обработанных серебром, обнаруживаются тонкостенные перегородки, проникающие под прямым углом в паренхиму органа. По ним проходят кровеносные капилляры, которые окружены периваскулярными эпителио-ретикулоцитами, основанными на базальной мембране.

Эпителиальный остов тимуса птиц состоит из плотно переплетающихся между собой широких тяжелой отростчатых клеток – эпителиоретикулоцитов. Идентифицировать их позволяет умеренная активность неспецифических эстераз в цитоплазме. В корковой части органа в ячейках эпителиального ретикулума располагаются кластеры лимфоцитов, зачастую формирующие фолликулоподобные скопления. Границей вокруг этих образований служат базальные мембраны, которыми подстланы расположенные по окружности эпителиоциты. В составе фолликулов из-за большого количества лимфоцитов эпителиальные клетки сильно раздвинуты, вследствие чего в срез попадают лишь фрагменты редко расположенных базальных мембран. Лимфоциты в составе фолликулов представлены главным образом бластами, среди которых очень часто встречаются картины митотического деления. Лимфобласты проявляют относительно высокую активность СДГ, что связано с их большой пролиферативной активностью. Довольно крупные,

темно-синие зерна формазана – продукта ферментативной реакции в один или два ряда располагаются в этих клетках вокруг ядер. В центральной части лимфоцитарных кластеров, благодаря высокой активности кислой фосфатазы в цитоплазме, выделяются макрофаги – крупные, отростчатые клетки (рис. 1).

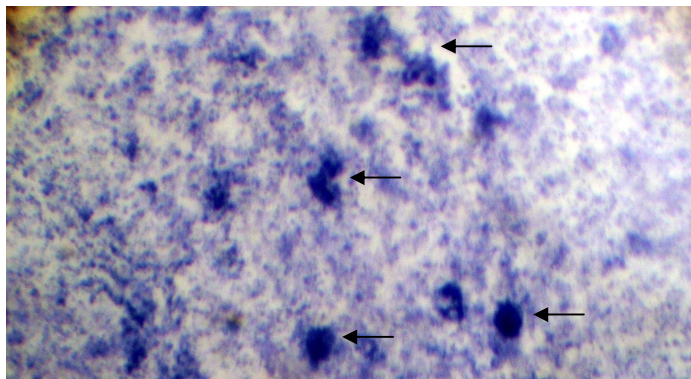


Рис. 1. Фрагмент тканей тимуса цыплят. Высокой активностью кислой фосфатазы отличаются макрофаги. Реакция азосочетания с фосфатом нафтола AS-BI. Ув. х 300.

На препаратах, обработанных серебром, лимфоциты коры, за исключением подкапсулярных нескольких рядов, окрашиваются в темно-коричневый цвет. Кора таким образом состоит из трех зон – субкапсулярной, фолликулярной и глубокой. Последняя также, как и межфолликулярные части, состоит главным образом из малых лимфоцитов.

Помимо вышеотмеченных макрофагов, в коре тимуса птиц выделяется еще один тип вспомогательных клеток, располагающихся группами, что свидетельствует об их клональном происхождении. Это – отростчатые клетки, с очень высокой активностью кислой фосфатазы, фермента, являющегося, как известно, маркером лизосом. Они характеризуются также очень большим объемом цитоплазмы, высокой активностью неспецифических эстераз и аргирофилией (рис.2).

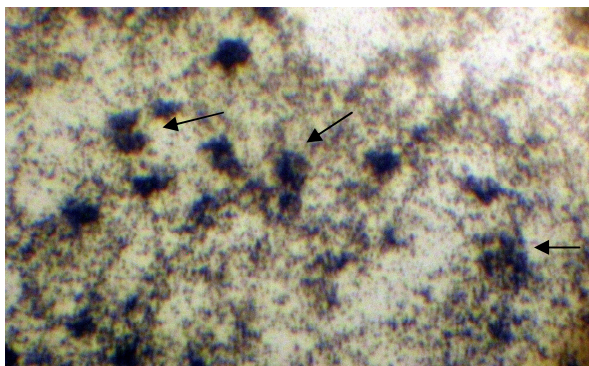


Рис. 2. Фрагмент тканей тимуса цыплят. Высокая активность неспецифических эстераз в макрофагах. Реакция с α -нафтилацетатом. Ув.х300.

Отмеченное позволяет приписать данным клеткам фагоцитарную функцию. В последние годы в тимусе человека идентифицирован и охарактеризован специальный тип корковых макрофагов – очень крупных [5], которые, по мнению авторов, являются разновидностью дендритных клеток. Им приписывается роль профессиональных “мусорщиков”, элиминирующих погибающие путем апоптоза лимфоциты. Исходя из вышеотмеченного, мы считаем, что описанные нами корковые фагоциты в тимусе птиц выполняют такую же функцию.

В мозговом веществе тимуса птиц лимфоцитов немного, вследствие чего базальные мембраны, на которых основаны тяжи эпителиоцитов, выявляются при импрегнации серебром в виде тонкопетливой сети (рис.3). Мозговое вещество тимуса домашней курицы инфильтрировано форменными элементами крови, в том числе эритроцитами. Здесь много кровеносных капилляров. Мозговое вещество иногда проникает в кору в виде тяжелой эпителиоцитов с небольшим количеством малых, по-видимому, зрелых лимфоцитов.

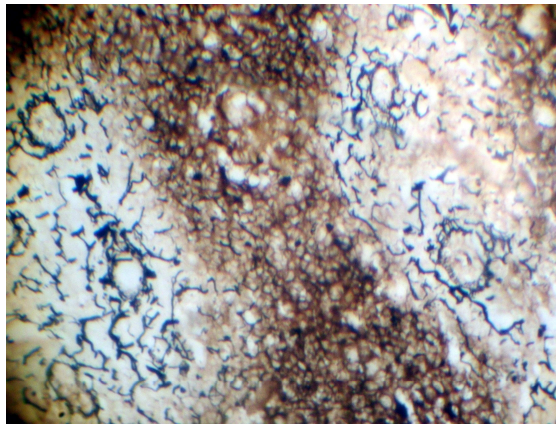


Рис. 3. Базальные мембраны в мозговом веществе тимуса цыплят. Импрегнация серебром по Фути. Ув.х300.

В тимусе цыплят есть многочисленные тучные клетки, расположенные исключительно в мозговом веществе, где образуют большие россыпи (рис. 4). Они крупные, большей частью овальные и имеют толстые, по-видимому, немногочисленные отростки. Ядро крупное, с двумя-тремя ядрышками. Цитоплазматические гранулы тучных клеток крупные, часто маскируют ядро. Они проявляют ярко выраженную метахромазию. Расположение тучных клеток в тимусе птиц по соседству с капиллярами указывает на их участие в регуляции деятельности гематотимического барьера.

В тимусе цыплят имеется много цист – округлых или трубкообразных небольших полостей, окруженных одним слоем кубической формы или уплощенных эпителиальных клеток. Они расположены в мозговом веществе, главным образом ближе к коре. Клетки, образующие стенки цист, проявляют высокую активность сукцинатдегидрогеназы и неспецифических эстераз, что весьма характерно для секреторных эпителиоцитов. Цисты на препаратах иногда пустые, но большей частью заполнены гомогенным оксифильным веществом. Тельца Гассалья в тимусе цыплят довольно крупные. Они состоят из больших, наложенных друг на друга крупных и уплощенных эпителиальных клеток. В тельцах можно увидеть одну или две зоны ороговения клеток.

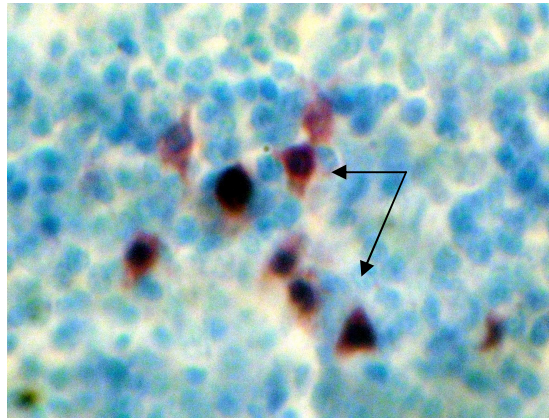


Рис.4. Тучные клетки в тимусе цыплят. Окраска толуидиновым синим. Ув.х300.

Таким образом, полученные данные дополняют наши представления о морфо-функциональных особенностях тимуса птиц. Описанная нами картина расположения лимфоцитов в тимусе цыплят и зон их активного митотического размножения позволяет предположить, что будущие Т-лимфоциты, попадая в тимус, активно пролиферируют в фолликулах коры. В окружении фолликулов и в глубокой коре находятся зрелые лимфоциты. Используемые методики позволяют выделить в коре тимуса птиц два вида фагоцитов. В тимусе цыплят имеются тучные клетки, которые располагаются исключительно в мозговом веществе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chan A.S. Ultrastructure of epithelial cells of the chick embryo thymus. *Acta Anat. (Basel)*, 150, 2, 96-103, 1994.
2. Chan A.S. Ultrastruktur of myoid cells in the chick thymus *Br Poult Sci.* 36, 2, 197-203, 1995.
3. Khalil M., Khan ZI., Khalil M., Islam R. A prospective study of prenatal and postnatal development of thymus of Dashi chicken. *Mymensingh Med J.* 12, 1, 20-24, 2003.
4. Olah I., Kendall C., Glick B. Endogenous peroxidase- and vimentin-positive cells accumulate at the corticomedullary border of the chicken thymus. *Poult Sci.* 70, 5, 1144-1152, 1991.
5. Wakimoto T., Tomisaka R., Nishikawa Y., Sato H., Yoshino T., Takahashi K. Identification and characterization of human thymic cortical dendritic macrophages that may act as professional scavengers of apoptotic thymocytes. *Immunobiology*, 213, 9-10, 837-847, 2008.

Поступила 20.07.2010



Biol. Journal of Armenia, 4 (62), 2010

GENETIC DIVERSITY OF *AEGILOPS TAUSCHII* POPULATIONS IN ARMENIA

N.A. HOVHANNISYAN, A.H. YESAYAN

Yerevan State University, Department of Ecology and Nature Protection,
E-mail: bionellibiotech@yahoo.com, ayesayan@ysu.am

The goal of this study was to assess the level of genetic diversity of wild *Aegilops tauschii* by means of RAPD markers. 15 RAPD primers generated total of 84 different sized fragments (loci) from DNA of 10 accessions of *Aegilops tauschii*, of which 79 markers were polymorphic over all accessions. The results obtained will allow to select genetically rich germplasm for sustainable *ex situ* conservation of studied populations.

Wild relatives - Aegilops tauschii - RAPD markers - genetic diversity

Հետազոտության նպատակն էր RAPD մարկերների կիրառմամբ գնահատել *Aegilops tauschii* պոպուլյացիաների գենետիկական բազմազանությունը: 15 RAPD պրայմերների կիրառմամբ 10 հետազոտված պոպուլյացիաների ԴՆԹ-ներից ամպլիֆիկացվել է ԴՆԹ-ի 84 հատված, որոնցից 79-ը պոլիմորֆ էին: Ստացված արդյունքները թույլ կտան ընտրելու և *ex situ* պայմաններում պահպանելու առավել հարուստ և բազմազան գենետիկական նյութ:

*Վայրի ցեղակիցներ - Aegilops tauschii - RAPD մարկերներ
- գենետիկական բազմազանություն*

Целью данного исследования было изучение генетического разнообразия популяций *Aegilops tauschii* с применением RAPD маркеров. С помощью 15 RAPD праймеров из ДНК 10 исследуемых популяций было амплифицировано 84 фрагмента, из которых 79 оказались полиморфными. Полученные результаты позволят отобрать для *ex situ* сохранения генетически богатый и разнообразный материал.

*Дикие сородичи - Aegilops tauschii - RAPD маркеры
- генетическое разнообразие*

Armenia is recognized as an important centre of agricultural biodiversity, which played a major role in the social and economic development of the country. Due to the abundance of wild relatives of cultivated plants the country was defined by Vavilov as one of the centers of cultivated plant diversity [4,23]. This diversity of wild progenitors of cultivated plants represents a rich gene pool for the creation of new crop varieties resistant to diseases, and other adaptive characteristics. Three out of four wild *Triticum* species occur in Armenia. These are *T. boeoticum* Boiss., *T. urartu* Thum. ex Gandil. and *T. araraticum* Jakubz. Nine *Aegilops* species with wide interspecific diversity have been found in Armenia.

As for other cereals, two species of wild rye, the annual *Secale vavilovii* Grosch. and the perennial *S. montanum* Guss. (36 varieties of which have been identified) and eight species of wild barley have been found. Wild two-rowed *Hordeum spontaneum* C.Koch and *H. bulbosum* L. are of special interest for breeding.

Armenia's richness of wheat biodiversity is of national and international significance. At the national level, it underpins many livelihoods and contributes substantially to national development. Some of the wild species are known to be drought-resistant, which is particularly important in Armenia due to its climate and frequent water shortages. Others may have disease resistance to wheat leaf rust and powdery mildew and can be used in crop improvement programs to produce new disease-resistant cultivars which will help in stabilizing yields, minimizing the use of chemicals and thus helping to protect the environment [5]. The use of wild relatives to improve Armenian wheat is an important strategy for the country, given that wheat is central to the country's food security, culture and customs [15].

Genetic resources are the gene pool available for breeders and other scientists, and in the Triticeae tribe several pools are recognized [19].

Crop wild relatives of wheat can be an important source of genetic diversity for supplying new effective resistance genes to modern wheat cultivars. *Aegilops tauschii*, the wild diploid D-genome progenitor of wheat, *Triticum aestivum* L., is an important source of resistance to several genes conferring higher protein quality and amino-acid content, and resistance to biotic stresses including pests and arthropods (Bahrai et al. 1998; Anker and Niks 2001). The value of wild species as a genetic resource for crop improvement depends on the amount of genetic variability they represent relative to cultivated crops. A large number of methods are available for the assessment of genetic variability, diversity and relatedness among germplasms as well as for molecular fingerprinting. *Ae. tauschii* is a self-pollinating species with occasional cross-pollination [2]. Genetic exchange between ssp. *tauschii* and other ones like ssp. *stragulata* in primary habitats of the species do exist and is rather common. For some species that have spread geographically in recent times, germplasm conservation can be effective and representative by collecting materials in the historical centre of genetic variability. It is known that *Ae. tauschii* is characterized with equilibrious and very fragmented population genetic structure, that is why it is quite important to assess genetic structure and the level of genetic diversity of the populations in order to maximize the chances of obtaining all unique allelic variants. It has been shown by Dudnikov [2] that in a single *Ae. tauschii* accessions extremely rare alleles at several loci can be found. Such accessions could be the source of unique allelic variants at many loci, including some with agricultural significance, particularly with drought, salt and disease resistance.

Several PCR-based systems are available that differ in complexity, reliability and information generating capacity. These include RAPD, SSR, AFLP, among others. Each system has its advantages and disadvantages. The introduction of RAPD (random amplified polymorphic DNA) Williams et al. [20] or AP-PCR arbitrarily primed-PCR [21], allowed DNA analysis using the polymerase chain reaction (PCR) in the absence of specific information on nucleotide sequences. It proved valuable in the characterization and evaluation of genetic diversity within and among species and populations. RAPD markers were used to analyze genetic variability and relationships among species, populations and accessions of *Aegilops* [12] who found that *A. ventricosa* (DDNN) segregated from the other species, probably owing to the influence of the D genome. *A. biuncialis* (UUMM), and *A. ovata* (UUMM), were clearly separated. In addition, correlation was found between RAPD markers and ecogeographical factors. The results of Kong et al.[11] showed that the ABD and S genomes of *Triticum* were most consanguineously grouped, genomes C and U had a relatively close relationship, and

genome D was distant from all other genomes. Genetic distance analysis of 29 accessions of two *A. tauschii* subspecies from different regions was assayed using RAPD. Two evident clusters based on the 297 RAPD bands revealed divergence between the two subspecies that was greater than that within one subspecies from different geographical regions: China, Iran and former USSR [11]. Genetic diversity among 18 Chinese accessions of *A. geniculata* was assessed using RAPD.

The objective of this study was to study pattern of genetic diversity in *Aegilops tauschii* different accessions collected from Armenia using RAPD markers.

Materials and Methodology. Ten accessions of *Aegilops tauschii* were chosen for RAPD marker analyses. The accessions of were obtained from ICARDA seed bank (Table 1, Fig.1).

Table 1. List of *Aegilops tauschii* accessions

No.	Species	Accession numbers Gatersleben (TRI), ICARDA (IG)	Origin	Lon	Lat	Alt
1	<i>Aegilops tauschii</i>	IG47173	Armenia (Syunik)	E46 22	N39 31	640
2	<i>A. tauschii</i>	IG126950	Armenia (Syunik)	E45 5814	N39 27 36	1.680
3	<i>A. tauschii</i>	IG48649	Armenia (Kotayk)	E44 44	N40 07	640
4	<i>A. tauschii</i>	IG 48748	Armenia (Kotayk)	E44 40	N40 11	1.300
5	<i>A. tauschii</i>	IG48758	Armenia (Aragatsotn)	E44 20	N40 15	1.350
6	<i>A. tauschii</i>	IG 126250	Armenia (Yerevan)	E44 36	N40 10	1.225
7	<i>A. tauschii</i>	IG126281	Armenia (Ararat)	E44 5415	N39 5213	1.355
8	<i>A. tauschii</i>	IG126337	Armenia (Vayots Dzor)	E45 2353	N39 4638	1.600
9	<i>A. tauschii</i>	IG 126371	Armenia (Vayots Dzor)	E45 1051	N39 4356	1.000
10	<i>A. tauschii</i>	IG 137567	Armenia (Armavir)	E043 51	N40 11 27	1.028

DNA isolation. DNA from young, seven day-old seedlings was extracted by application of a modified Doyle protocol with addition of activated charcoal [1]. Fresh leaves (five plants of each accession, 5 mg) were harvested to 2 ml tubes, frozen at -20°C at least one day before the day of extraction. After grinding the material with the pestle, 700 μl extraction buffers with 1 w/v activated charcoal (warmed to 65°C) were added. The samples were incubated at 65°C in water bath for 35 min. After incubation, 700 μl of a mixture of chloroform and isoamyl alcohol (25:1/vol) were added and shaken strongly. After centrifugation (10 min. at 8000 rpm.) the top phase was transferred to a new Eppendorff tube. The chloroform-isoamyl alcohol extraction was repeated once again. The supernatant was then transferred to a new Eppendorff tube and added with 85 μl of acetate mix (6 parts of 3 M NaOAc solution and 5 parts of 10 M NH_4OAc solution) and 500 μl isopropanol. The precipitate was centrifuged at 13.000 rpm for 30 min., the supernatant was removed and the DNA was washed with 1 ml of 70% ethanol, and then centrifuged for 10 min. at 13.000 rpm. The pellet was air-dried and resolved with 100 μl TE buffer. The extracts were stored at -20°C until use.

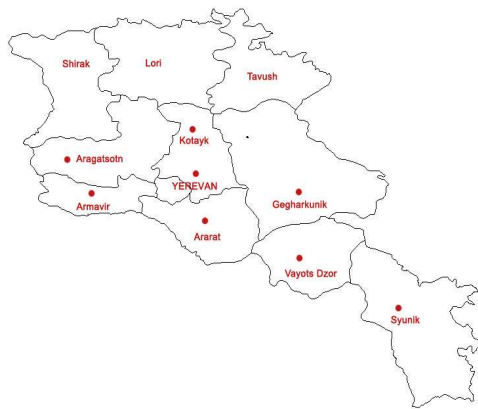


Fig.1. Map of Armenia showing distribution of *Aegilops tauschii* populations.

PCR amplification and gel electrophoresis. Each sample contained 0.05 μ l of Taq polymerase (Gatersleben, Genome Center, and Evrogen, Russia), 2.5 μ l PCR buffer, 10 μ M of forward/reverse primers, 2.5 mM of each dNTP and about 50 ng of plant DNA. For RAPD analyses 18 10 mer primers were used: OPA01, OPA02, OPA03, OPA04, OPA05, OPA11, OPA13, OPA18, OPE03, OPE04, OPE07, OPE11, OPE15, OPE20, OPC02 [14]. PCR (Biokom PCR amplifier) amplification program for RAPD was 94 $^{\circ}$ C – 1.5 min, 40 cycles (94 $^{\circ}$ C – 30 sec., 36 $^{\circ}$ C – 1 min, 72 $^{\circ}$ C – 1 min), 72 $^{\circ}$ C – 10 min.

PCR amplified RAPD DNA fragments were electrophoresed in 2% agarose gels at 110 V for about 2 hours, stained with ethidium bromide, visualized under UV light and photographed. Gel images were captured in TIF files and analyzed.

To analyse obtained molecular genetic data Popgene32 and TreeView software was used. Data were analysed on the basis of the presence (1) or absence (0) of the amplified products. Pair-wise comparisons of accessions based on presence/absence of unique and shared polymorphic products were used to generate the observed number of alleles, effective number of allele, Nei's gene diversity, and percentage of polymorphic alleles.

Results and Discussion. A total of 70 random decamer primers were evaluated for their ability to prime PCR amplification of DNA from 10 *Aegilops tauschii* accessions that were randomly selected. Fifteen (OPA01, OPA02, OPA03, OPA04, OPA05, OPA11, OPA13, OPA18, OPE03, OPE04, OPE07, OPE11, OPE15, OPE20, OPC02) that showed consistently reproducible polymorphisms were selected and used to analyze DNA of all the 10 *Aegilops* accessions included in this study.

A summary of the RAPD marker data for fifteen primers and distribution across the *Aegilops* accessions is given in Tab. 2.

The primers generated total of 197 different sized fragments (loci), of which 79 markers were polymorphic over all accessions. An example of typical RAPD variation for a single primer is shown in Fig. 2.

The capability of different primers to generate RAPD markers ranged from 87 to 161 over all accessions. The number of polymorphic loci per population for all primers ranged from 77 (population 6) to 89 for (population 5).

Based on the Nei's (1973) gene diversity index the mean diversity indices for the 10 accessions ranged from 0.5374 to 0.6730. This range of diversity indices indicated a high level of polymorphism at the DNA level among accessions. The level of genetic differentiation among *Aegilops tauschii* local populations of *Ae. tauschii* is high: the value of Nei's coefficient of genetic differentiation, GST, was 0.53 and the estimate of gene flow between them was 9.5. The low G_{st} values indicate the low migration capaci-

ty, that is why the local populations separated from each other by a distance of only a few kilometres can differ considerably. On fig. 3 the dendrogram for the studied population is shown, where it is clear that the populations located near each other have been divided by clusters.

Table 2. Genetic diversity of *Aegilops tauschii* populations by RAPD markers

No.	Accessions	Observed number of alleles	Effective number of alleles	Nei's gene diversity	The number of polymorphic loci %
1	IG47173	1.9705	1.6328	0.5694	79
2	IG126950	1.9567	1.6442	0.5730	78
3	IG48649	1.9615	1.6012	0.6730	88
4	IG 48748	1.9167	1.5779	0.5374	85
5	IG48758	1.9643	1.6024	0.6512	89
6	IG 126250	1.9405	1.6011	0.5481	77
7	IG126281	1.9405	1.5595	0.6212	87
8	IG126337	1.9405	1.5932	0.5450	75
9	IG126371	1.9478	1.6257	0.5730	78
10	IG 137567	1.9286	1.5859	0.5420	78

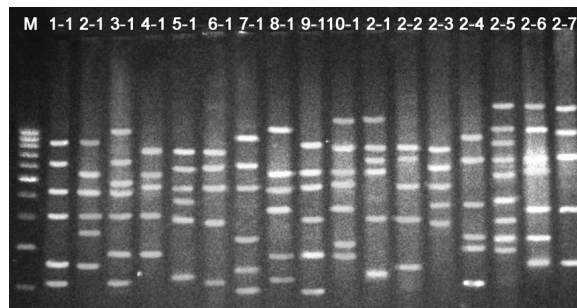


Fig. 2. RAPD patterns of *A. tauschii* accessions obtained with primer OPA02 (lines 1-1-10-1) and with primer OPE04 (lines 2-1-2-7), M: DNA size markers (DNA Molecular Weight Marker, Fermentas, 100 bp ladder).

The average level of genetic drift also plays an important role, since *Ae. Tauschii* local populations are small and relatively isolated. If only some *Ae. tauschii* local population remained isolated and free from immigration over a long period of time, it may have become a “trap” for rare alleles because of fixation of slightly deleterious alleles [2]. The same results have been obtained by Dudnikov [2], who has shown the interspecies similarity of Gst for *Aegilops* ssp. *tauschii* and for ssp. *Strangulate*.

Exchange of just 1–2 individuals per generation between populations erases genetic differences between such populations (Hedrick 1999), therefore the average migration capacity of *Ae. tauschii* seems not to exceed one kilometer per year (i.e. per generation, since it is an annual plant). Taking into account the huge range of this spe-

cies, it can be estimated that the time necessary for *Ae. tauschii* geographic expansion is about 10^5 generations (years). These results are proved the importance of populations of *Aegilops tauschii* as a sources of important, unique agricultural traits. High levels of interpopulation polymorphism were recorded in two Einkorn wheats, *Triticum monococcum* (Mn) and *T. boeoticum* (Bt) [10], in *Hordeum* species [6], in *Aegilops cylindrica* [7].

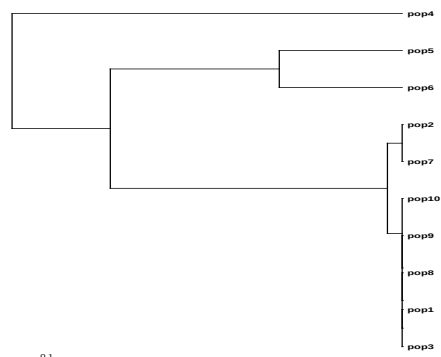


Fig.3. Dendrogram constructed for all the primers studied.
For explanations of pop1-10, see Table 1.

RAPD-PCR was useful for studying genetic variability among *Aegilops* species. It was used to study the genetic diversity of different *Aegilops* species [7, 13], *A. geniculata* [21], wild emmer and durum wheat [7,8], wheat [9,17,18] and *Hordeum* [6, 16].

There is a concern expressed in the literature regarding the reproducibility of RAPD patterns from one experiment to another. In this study reproducibility of these results was evaluated by replicating the RAPD analysis done on all the accessions two to three times with five primers. Reproducibility averaged 94%. Thus under stringent reaction conditions RAPD patterns were highly reproducible.

These results demonstrated also that RAPD-PCR analysis is useful to assess the extent of genetic diversity among *Aegilops* accessions and can provide practical information for the management of genetic resources collection and identification. Obtained results are showing importance of further investigations of genetic structure and genetic diversity within and between populations of studied plants. There is need to use AFLP markers, as these markers are co-dominant instead of RAPD and highly reproducible.

Conclusions

The use of plant genetic resources (PGR) in crop improvement is one of the most sustainable methods to conserve valuable genetic resources for the future and simultaneously to increase agricultural production and food security. Our results show that the territory of Armenia is one of the rich sources of wild relatives of wheat that can be useful source of germplasm for breeding programs to create new crops and new uses for existing crops, to meet breeding objectives for sustainability of crop production.

The molecular analyses protocols for screening genetic diversity in Armenian wild accessions of *Aegilops tauschii* have been optimized.

RAPD analyses can be recommended as cheap options to assess level of genetic diversity and breeding potential in wild populations of wheat in Armenia.

So, the isolated populations of *Aegilops tauschii* in Armenia can be a sources of important agricultural traits and need further investigation for their sustainable conservation and use in marker assisted selection. The results obtained will help to select genetically rich germplasm for sustainable *ex situ* conservation of studied populations. Also these data can be used efficiently in breeding programs for improvement of existing cultivars.

ACKNOWLEDGEMENTS

The project was supported in by the ANSEF grant No.1838. Authors wish to thank ICARDA seed bank and IPK for providing seed materials.

REFERENCES

1. Doyle J. and Doyle J. Focus, 12, 13-15, 1990.
2. Dudnikov, A.Ju. Allozyme variation in Transcaucasian populations of *Aegilops squarrosa*. Heredity 80, 248–258, 1998.
3. Farkhari M., Naghavi M.R., Pyghambari S.A. and Sabokdast S. (2007) Pakistan Journal of Biological Sciences, 10(17), 2868-2873.
4. Gandilyan P.A. and Avagyan W.A. Erebuni Reservation. Tigran Mets, Yerevan, 2001.
5. Gill B., Friebe B., Raupp W., Wilson D., Cox T., Sears R., Brown-Guedira G. and Fritz A. Advances in Agronomy, 85, 73-135, 2006.
6. Gonzalez J.M. and Ferrer E. Genome, 36, 1029–1031, 1993.
7. Harish T. Gandhi, M. Isabel Vales, Carol Mallory-Smith and Oscar Riera-Lizarazu Theoretical and Applied Genetics, 119, 6, 1013-1025, 2009.
8. Hovhannisyan N.A., Dulloo M.E., Yesayan A.H. and Danielian A.M. In. 23th annual meeting of the Society for Conservation Biology. 11-16 July, Beijing, China. p.29, 2009.
9. Joshi C.P. and Nguyen H.T. Genome, 36, 602–609, 1993.
10. Kojima T., Nagaoka T., Noda K. and Ogihara Y. Theoretical and Applied Genetics, 96, 37-45, 1998.
11. Kong L., Dong Y., Jia J., Kong L.R., Dong Y.C. and Jia J.Z. Acta Botanica Sinica, 40, 223- 227, 1998.
12. Munns R. & Richards R.A. Advances in Molecular Breeding toward Drought and Salt Tolerant Crops (eds. M.A.Jenks, et al.), Springer-Verlag, Berlin. 2007.
13. Okuno K., Ebana K., Noov B. and Yoshida H. Genetic Resources and Crop Evolution, 45, 389–394, 1998.
14. Oliveira C.M., Mota M., Monte-Corvo L., Goulao L. and Sliva D.M. Scientia-Horticulturae, 79, 163-174, 1999.
15. Pretty J. and Haykazyan V. Sustainability in Armenia: New Challenges for the Agricultural Sector. Colchester, UK, 2006.
16. Svetlana L., K. Viktor and B. Andreas. Euphytica. 156, 271–296, 2007.
17. Sun Q., Huang T.C., Ni Z.E. and Procunier J.D. Journal of Agricultural Biotechnology, 4, 103–110, 1996.
18. Vierling R.A. and Nguyen H. Theoretical and Applied Genetics, 84, 835–838, 1992.
19. Von Botmer R., Seberg O. and Jacobsen N. Hereditas, 116, 141-150, 1992.
20. Williams J.G., Kubelik A.R., Livar K.J., Rafalskt J.A. and Tingey S.V. Nucleic Acids Research, 18, 6531–6535, 1990.
21. Welsh J. and McClelland M. Nucleic Acids Research, 18, 7213–7218, 1990.
22. Zhang X.Y., Wang R.R. and Dong Y.S. Genetic Resources and Crop Evolution, 43, 429–433, 1996.
23. Zhukovsky P. Crop plants and their wild relatives. Kolos, Leningrad (in Russian), 1971.

Received 12. 10. 2010



DETERMINATION OF MERCURY CONCENTRATION IN BANDAR IMAM MARINE SEDIMENTS (PERSIAN GULF)

M. GODARZINIK, K.V. GRIGORYAN, H.S. MOVSESYAN

Yerevan State University, Faculty of Biology, Department of Ecology and Nature Protection
E-mail: m_godarzi_nik@yahoo.com, G.Karlen@mail.ru, hasmikmov@yahoo.com

The effect of mercury from chloroalkaline unit of Bandar Imam, Iran petrochemical complex (BIPC) has been investigated. 15 stations were chosen in distinct and regular intervals. The samples were taken on depth of 0—10, 10—20 and 20—35 cm in industrial wastewater discharge point to the Persian Gulf. They were transferred to the laboratory and autoclaved at 60-70°C for 48 hours. After drying the samples were mixed and analyzed by using mercury analyzer 254 AMA (Leco). Experiments showed that the concentration of mercury in different samples was high (29-10031 ppb) in comparison with its concentration in Asalloyeh Blank region (12-22 ppb). It was resulted that the concentration of mercury in sediments of Bandar Imam was higher than in standard and blank region because of petrochemical activities and chloride spilling. As the horizontal and vertical distances from the wastewater discharge point were being increased, mercury concentration reduced gradually.

Marine sediments - Persian Gulf – Asalloyeh - Bandar Imam - Mercury

Ուսումնասիրվել է Բանդար Իմամ, Իրան նավթաքիմիական համալիրի քլորալկալիական բլոկից շրջակա միջավայր թափվող սնդիկի ազդեցությունը: Ընտրվել են միմյանցից կանոնավոր հեռավորությունների վրա գտնվող 15 կայաններ: Նմուշները վերցվել են 0-10, 10-20 և 20-35 սմ խորության վրա՝ Պարսից ծոց արտադրական հոսքաջրերի թափման վայրում: Նմուշները տեղափոխվել են լաբորատորիա և մշակվել ավտոկլավում 60-70°C պայմաններում 48 ժամվա ընթացքում: Չորացնելուց հետո նմուշները խառնվել, այնուհետև վերլուծման են ենթարկվել սնդիկի 254 AMA (Leco) վերլուծիչի օգնությամբ: Ուսումնասիրությունները ցույց են տվել, որ սնդիկի խտությունը տարբեր նմուշներում բարձր է և գտնվում է 29-10031 ppb սահմաններում՝ ի տարբերություն Ասալոյե չաղտոտված վայրի, որտեղ այն կազմում է 12-22 ppb. Արվել է եզրակացություն, որ նավթաքիմիական աշխատանքների և քլորիդների թափման պատճառով սնդիկի խտությունը Բանդար Իմամի նստվածքներում ավելի բարձր է, քան չաղտոտված ստուգիչ տարածքում: Արտադրական հոսքաջրերի թափման վայրից հորիզոնական և ուղղահայաց հեռացման ժամանակ արձանագրվել է սնդիկի խտության աստիճանական նվազեցում:

Օվալյին նստվածքներ - Պարսից ծոց - Ասալոյե - Բանդար Իմամ - սնդիկ

Изучено влияние ртути, поступающей в среду с хлор-щелочного блока нефтехимического комплекса Бандар Имам, Иран. Было выбрано 15 станций в регулярных интервалах. Образцы брались на глубине 0-10, 10-20 и 20-35 см в месте слива в Персидский залив промышленных сточных вод. Образцы переносились в лабораторию и обрабатывались в автоклаве при 60-70°C в течение 48 ч. После высушивания образцы перемешивали и анализировали с

использованием ртутного анализатора 254 AMA (Leco). Исследования показали, что концентрация ртути в различных образцах высокая и находится в пределах 29-10031 ppb в отличие от незагрязненного региона Асалоие, где она составляет 12-22 ppb. Было сделано заключение, что концентрация ртути в осадках Бандар Имама из-за нефтехимических работ и сброса хлоридов была значительно выше, чем в контрольном незагрязненном регионе. При горизонтальном и вертикальном удалении от точки слива промышленных сточных вод было зарегистрировано постепенное уменьшение концентрации ртути.

Морские осадки - Персидский залив – Асалоие - Бандар Имам - ртуть

Hg is amongst the poisonous and heavy metals that pollute water resources and sediments when used in several industries, for example, as an electrode in electrolytic decomposition of the salt (NaCl) to produce chlorine. Hg compounds decompose rarely and accumulate in some organisms such as fish and shrimp. Intoxication due to eating fishes contaminated with Hg has been observed in several parts of the world, including Minamata (Japan) that has attracted the researchers' attention to the detrimental effects of using contaminated sea organisms (fishes). This research was conducted to study the effects of hazardous wastage of the chloroalkaline unit of petrochemical zone of Bandar Imam. In this location where the wastage pours into the sea the sediments were analyzed [1, 2, 3, 7]. In order to measure Hg concentration in the sediments a field inspection of the mentioned area was done, stations were chosen and specified samplings were drawn (0-35 cm).

The following objectives were in mind while choosing the stations:

- determination of the relationship between Hg concentrations of the sediments and increasing of horizontal distance from the exit,
- determination of the relationship between Hg concentration and increasing of sediment depth,
- determination of the effect of dominant North-west (Nw) winds and ebb and flow on the distribution of Hg contamination in the sediments,
- determination of the relationship between Hg concentration and increasing of water depth.

Materials and Methods. The site is located in the northern part of the Persian Gulf (Bandar Imam) (Fig. 1 and 2).



Fig. 1. Map of the studied area



Fig. 2. Map showing the sampling location area

The geological history of the site reveals that about 500 million years ago in Precambrian period, the solid crust of the earth was united i.e. the continents were connected to each other because of the movement and water penetration into the hole due to the volcanic activities. Some continents and oceans were developed and in the midst of the third era the Persian Gulf was appeared and it was attributed to the extension of Oman Sea into a syncline whose axe is along Zagros, with a little deviation to the west.

Persian Gulf in the south coast is low and sandy. Its floor is muddy and contains some sandy hills and coral reefs which are amongst the most impotent areas of fishing and pearling.

The climate is dry and subtropical. The weather is hot during 7-8 months in a year and the temperature reaches to 50°C, being temperate from November to February.

The bed of the site (Bandar Imam) is composed of clay. Because of the low depth of Persian Gulf, high temperatures and winds the surface evaporation is relatively high. The amount of evaporated water is more than the entering water. Ebb and flow differ in various parts.

Sedimentation occurs because of the wind, ebb and flow and sea streams. The stream wave's speed reaches 11 km/day in a counterclockwise direction. These streams become weak at the end of Persian Gulf (Fig. 2) and don't transfer the sediments.

During the investigation appropriate methods were used [5, 6, 8].

In order to determine Hg concentration in the sediments of Bandar Imam, a field inspection from Khowre-musa, between N=26°-30' and E=7°-49' in the north of Persian Gulf was conducted, then by sampling instruments and a motorboat the sampling was carried out at the depths from 0.5 to 4.5 m on specified distances (every 200 meters). The direction as in the Fig. 2 was from the fishery propagation center in Mahshahre on Sarbandar road to the point that is located in 18 km from Bandar Imam petrochemical wastage exit. The sampling was done in spring during ebb and flow. At first 15 stations determination was conducted in specified distances with a Garmin model GPS. The sampling was done every 50 meters on the radius of area with 5 samples. Fig. 2 shows the path and position of the station in Bandar Imam.

In order to analyze Hg in the sediments, the samples were taken to the laboratory and placed into autoclave at 60-70°C for 48-hours and often drying, were put in crucible and passed through №100 mesh. Equal amounts of each sample from each known depth were mixed to obtain a homogenous sample. To measure the concentration of Hg in the sediments of the stations, specified amount of each sample was carried to the environmental laboratory of the School of Natural Resources and Sea Sciences of Tarbiat Modarres University for analysis with Leco AMA 254 mercury analyzer. This experiment was replicated three times in each station and the mean of these replications has been reported. The above mentioned instrument before the samples analysis was calibrated with the BCR, NIST standard D67.



Fig. 3. Map showing the sampling stations

Results and Discussion. Results of Hg concentration analysis in different stations of Bandar Imam based on the depth with at least 3 replications and Hg concentration analysis in control station are shown in Tables 1 and 2, respectively. In order to present Hg concentration on different depths more precisely, the histogram chart of Hg mean concentrations in different stations is shown on Fig. 4.

Table 1. Hg concentration analysis (ppb) in different stations of Bandar Imam on the depth (Mean $\pm$ SD, 3 replications)

No of the station	Depth		
	0-10 cm	10-20 cm	20-35 cm
1	10031	6306	543
2	7593	1931	215
3	7375	7609	2112
4	5703	6933	105
5	4302	3302	2221
6	2769	2820	2405
7	2985	2625	188
8	2917	715	705
9	1969	2225	355
10	1145	801	730
11	643	471	344
12	417	355	145
13	347	176	29
14	146	6015	209
15	101000	26055	247504
Standard of deviation	25366.97	6559.331	247.504

Results of Hg concentration analysis in the sediments of Bandar Imam (Tab. 1) indicate:

- measurement of Hg concentration in the sediments of Bandar Imam (Khowremusa), at the sewage exit of Bandar Imam petrochemical chloroalkaline unit shows that the highest concentration of Hg is in the station 1 that is located in 200 m from the sewage exit point. In most of the stations the highest concentration of Hg is on the depth 0-10 cm,
- by increasing of sediments' depth Hg concentration decreases gradually, so that it becomes near zero in lower depths,
- the station 12 is the place for releasing fishes and shrimps of the fishery propagation center of Mahshahre and is located in 18 km from the chloroalkaline unit sewage exit source and is regarded as the control station of Bandar Imam. Table 1 shows that in the station 12 the pollution amount is higher than the EPA standard (2-5 ppm),
- the results show that the difference between the northern and southern stations' concentration is not significant. So waves of ebb and flow and dominant winds don't transfer the pollution. The station 15 which is located within the petrochemical site (50 m before entering the sea) has the highest Hg concentration in comparison with other stations,
- sampling in the above mentioned stations and the geological history of the area indicate that the origin of sediments' pollution (Hg) is the petrochemical chloroalkaline unit of Bandar Imam,
- in order to get some confidence on the results and the pollution source the sampling procedure was also done in the special zone of Asalloyeh.

Results showed that Hg concentration in Asalloyeh was lower than standard (around 12-22 ppb). Values were much lower than Hg concentration in Bandar Imam sediments (Table 2).

Table 2. Hg concentration analysis (ppb) in different stations of Asalloyeh (Mean $\pm$ SD, 3 replications)

N $^{\circ}$ of the station	1	2	3	4	5	6	Deviation
Concentration	18	17	17	17	12	22	3.1885

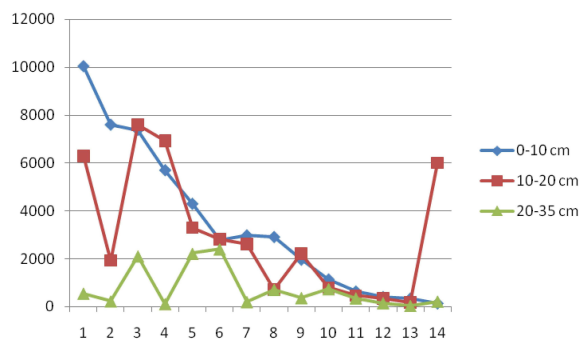


Fig. 4. Hg concentration analysis (ppb) in stations 1 to 14 of Bandar Imam on the depth (Mean $\pm$ SD, 3 replications)

It has been also designed to measure the least amount of Hg in sediments and liquids which acts on the basis of pure 99.99 oxygen combustion that contains a combustion catalysts tube and decomposes the sample in oxygen-rich media. In this way the unwanted elements are separated. The instrument is calibrated on the standard wavelength of 253.7 nm and includes a golden trap. This trap adsorbs the collected or released Hg from the sample. This method is faster and more confident than the other methods. The phases of the method are:

- 1- decomposition time: 305 s,
- 2- drying time: 60 s,
- 3- degradation time: 200 s,
- 4- waiting time: 45s.

Hg in the petrochemical zone of Bandar Imam is washed in chloroalkaline industries by cellular method. The area sediments have been polluted because of Hg-containing sewage movement into the Persian Gulf. Moreover because of Hg movement attributed to the areas affected by the imposed war, it has entered the waters. This is especially evident in the statistics of Iran's Hg imports to restore the petrochemical zone of Bandar Imam in 1992 [2]. So as the Tab. 1 and 2 and the Fig. 4 show, Hg mean concentrations in the depth 0-10 cm vary from 146 to 10031 ppb, in the depth 10-20 cm they vary from 176 to 7609 ppb and in the depth 20-35 cm - vary from 29 to 2405 ppb. Therefore, it is necessary to separate this metal from the sewage by different processes. As the main origin of Hg movement into the sediments is due to the sewage of chloroalkaline unit of Bandar Imam petrochemical zone, Hg should be refined and recycled.

Results from different stations indicate that:

1. by increasing of the horizontal distance from the sewage exit point of chloroalkaline unit of Bandar Imam petrochemical zone, Hg concentration in the sediments decreases gradually,
2. according to the area geology, the bed soil is consisted of clay (with negative ions). As Hg is a positive ion, it forms a stable legend complex with clay and remains on the surface so Hg concentration decreases while increasing the sediments depth,
3. results of northern and southern stations show that the dominant wind is north-west and the waves (which are in the same direction with the dominant wind) don't move pollution [4],
4. according to the geographical position of the area which is located at the end part of the Persian Gulf, ebb and flow of this area are weak and don't transfer the pollution,
5. Hg has a high specific weight so it precipitates immediately after entering the low depth areas. Then Hg concentration decreases while increasing water depth,
6. the main polluting factor of the area is the chloroalkaline industry sewage of Bandar Imam.

Suggestions

1. In order to control the movement of Hg in the area the sewage exit of Hg factories must be checked.
2. The cellular petrochemical and chloroalkaline industries should be cancelled. In turn, a membrane system has to be used.
3. The factories' sewage must be refined and checked properly.

REFERENCES

1. *Barnes H. L., Seward T. M.* Geothermal systems and mercury deposits, in: H. L. Barnes (Ed). *Geochemistry of hydrothermal ore deposits*, Wiley, New York, 699-736, 1997.

2. *Esmaili Sari*. Pollutants, health and environmental standards, Nagshe-Mehr Press, Iran, 67-82, 2003.
3. *Grassi S., Netti R.* Sea water intrusion and mercury pollution of some coastal aquifers in the province of Grosseto (Southern Tuscany-Italy), *Journal of Hydrology*, 237, 198-211, 2000.
4. Iranpana. Stratigraphy, Tehran University Press, Iran, 23-60, 1981.
5. *Marins R.V., Delacerda L.D., Villa Bosa R.C.* Relative importance of non-point sources of mercury to an industrialized coastal system: Spetiba bay, Se barazil. in Ebinghaus R., Turner R.R., Delacerda L.D., Vasiliev O., Salomons W. (Eds), *Mercury contaminated sites*, Springer, Berlin, 207-220, 1999.
6. *Schwarzenboch G., Widmer M.* Die loslichkeit von metal sulfide. I. schwarzes Queckilbersulfid. *Helv. chim. Acta* 46, 2613-2628, 1963.
7. *Tomiyasu T., Nagano A., Yonehara N., Sakamoto H., Rifardi, Oki K., Akagi H.* Mercury contamination in the Yatsushiro Sea, south-western Japan: spatial variations of mercury in sediments, *The Science of the Total Environment*, 257 121-132, 2000.
8. *Turner R.R., Southworth G.R.* Mercury-contaminated industrial and mining sites in North America: an overview with selected case studies, in Ebinghaus R., Turner R.R., Delacerda L.D., Vasiliev O., Salomons W. (Eds), *Mercury contaminated sites*, Springer, Berlin, 89-112, 1999.

Received 18.09.2010



PHYLOGENETIC DIVERSITY BASED ON 16S rRNA GENE SEQUENCE ANALYSIS OF AEROBIC THERMOPHILIC ENDOSPORE-FORMING BACTERIA ISOLATED FROM GEOTHERMAL SPRINGS IN ARMENIA

H.H. PANOSYAN

Yerevan State University, Faculty of Biology, Department of Microbiology
and Plant and Microbe Biotechnology, Email: hpanosyan@yahoo.ca

Nineteen thermophilic aerobic endospore-forming bacteria were isolated from Armenian terrestrial hot (Arzakan) and warm (Akhourik) geothermal springs. The phylogenetic and taxonomic diversity of isolates was studied by the 16S rRNA gene (16S rDNA) analysis. The comparison of generated 16S rDNA sequences of the isolates with the ones available in GenBank database indicates their relation to phylum *Firmicutes*, subphylum *Clostridium-Bacillus*, group of *Bacillus*-like genera. The isolates are related to eleven species distributed in five genera: *Bacillus*, *Geobacillus*, *Sporosarcina*, *Paenibacillus*, and *Thermoactinomyces*. The thermophilic endospore-forming microflora was less diverse in the Akhourik spring and included representatives of genera *Bacillus* and *Thermoactinomyces*, with predominance of *Bacillus* species. Representatives of the genus *Geobacillus* were prevailing in the hot spring, in total constituting 50% of the detected isolates.

*Geothermal springs – thermophiles – Bacillus and related genera – 16S rRNA
gene (16S rDNA) sequence – phylogeny*

Հայաստանի տաք (Ախուրիկ) և ջերմային (Արզական) հանքային աղբյուրներից մեկուսացվել են տասնինը թերմոֆիլ աերոբ էնդոսպոր առաջացնող բակտերիաներ և ըստ 16S ռԴՆԹ-ի գենի (16S ռԴՆԹ) նուկլեոտիդային հաջորդականությունների վերլուծության ուսումնասիրվել է դրանց տաքսոնոմիական և ֆիլոգենետիկական բազմազանությունը: Մեկուսացված կուլտուրաների 16S ռԴՆԹ-ի նուկլեոտիդային հաջորդականությունների համեմատումը GenBank-ի տվյալների բազայում առկա հաջորդականությունների հետ հաստատել է դրանց պատկանելիությունը *Firmicutes* ֆիլումին, *Clostridium-Bacillus* ենթաֆիլումին, *Bacillus* և ազգակից ցեղեր խմբին: Մեկուսացված շտամները նույնականացվել են որպես 11 տեսակներ՝ բաշխված *Bacillus*, *Geobacillus*, *Sporosarcina*, *Paenibacillus* և *Thermoactinomyces* ցեղերում: Թերմոֆիլ էնդոսպոր առաջացնող միկրոֆլորան Ախուրիկի հանքային աղբյուրում քիչ բազմազան է և ներառում է *Bacillus* և *Thermoactinomyces* ցեղերի ներկայացուցիչներ՝ *Bacillus* ցեղի տեսակների գերակշռմամբ: *Geobacillus* ցեղի տեսակները գերակշռում են ջերմային աղբյուրում՝ կազմելով մեկուսացված տեսակների 50%:

*Երկրաջերմային աղբյուրներ – թերմոֆիլներ – Bacillus և ցեղակից տեսակներ –
16S ռԴՆԹ-ի գենի (16S ռԴՆԹ) հաջորդականություններ – ֆիլոգենիա*

Из наземных теплых (Ахурик) и горячих (Арзакан) геотермальных источников Армении изолированы девятнадцать термофильных аэробных эндоспорообразующих бактерий. На основании анализа гена 16S рРНК (16S рДНК)

изучено их филогенетическое и таксономическое разнообразие. Сравнение последовательностей 16S рДНК изолятов с нуклеотидными последовательностями базы данных GenBank'a указывает на их принадлежность к филуму *Firmicutes*, к подфилуму *Clostridium-Bacillus*, к группе *Bacillus* с родственными родами. Изоляты отнесены к 11 видам пяти родов: *Bacillus*, *Geobacillus*, *Sporosarcina*, *Paenibacillus*, *Thermoactinomyces*. Термофильная эндоспорообразующая микрофлора менее разнообразна в теплом источнике и включает виды родов *Bacillus* и *Thermoactinomyces*, с доминированием представителей рода *Bacillus*. Представители рода *Geobacillus* доминируют в горячем источнике, составляя в целом 50% обнаруженных изолятов.

Геотермальные источники – термофилы – Bacillus и родственные роды – секвенс гена 16S рРНК (16S рДНК) – филогения

Microbial ecology of geothermal springs located in different parts of the world has been arising interest of scientists during the last decades [5, 10, 12, 19]. Natural geothermal springs are primarily associated with tectonically active zones. Numerous warm and hot mineral springs of different geotectonic origin and with different physical-chemical properties are found in Armenia, where evidence of recent active volcanism is still noticeable [1].

Thermophilic microorganisms are not grouped into a separate taxonomic unit, but appear in various taxonomic groups and at various phylogenetic distances throughout the taxonomic system [2, 5, 9, 17]. Representatives of the genus *Bacillus* and related genera have been shown to be the thermophilic aerobes most frequently isolated from terrestrial geothermal water environments [10, 12, 23]. Numerical classification based on a series of phenetic characteristics is used for identification and classification of bacilli [14, 21]. At the present, the phylogenetic approach to *Bacillus* and related genera taxonomy is accomplished mainly by analysis of 16S rRNA genes (16S rDNA) [8, 16, 20, 25].

Distribution of some groups of extremophilic bacilli in different natural habitats (mainly in soils) and investigation of their biotechnological potential have appeared the basic directions of microbiological research in Armenia [6]. In this context, geothermal springs located in Armenia represent unique natural habitats of the thermophilic microbes. Recently, distribution of cultivable aerobic thermophilic endospore-forming bacteria in some geothermal springs of Armenia was studied and characterized tentatively based on the phenotypic features [3]. The present study reports on the phylogenetic diversity of cultivable thermophilic aerobic chemoorganotrophic endospore-forming bacteria isolated from earlier uninvestigated warm (Akhourik) and hot (Arzakan) geothermal springs of Armenia based on the analysis of their 16S rRNA genes.

Materials and Methods. *Sampling and physical-chemical measurements.* The location of warm (Akhourik) and hot (Arzakan) geothermal mineral springs of Armenia was determined using GPS technology. Water temperature and pH were measured *in situ* using a portable combined pH/EC/TDS/Temperature tester (HANNA HI98129/HI98130). Water and sediment samples of the studied springs were collected in sterile bottles and maintained on ice until processed. Sampling and all physical-chemical measurements were made in November 2008.

Enrichment experiments and microscopy. To enrich aerobic thermophilic bacteria, filtrate of water (1l filtered through 0.4 µm membrane filters) and sediment (1g) samples were inoculated in Nutrient Broth (Difco) and incubated overnight at 50, 60 and 65°C with shaking at 240 rpm. Before inoculation, all samples were treated at 80°C for 10 min to isolate the endospore-forming microorganisms only [4]. Cultures were further purified by streaking samples on the same medium supplemented with agar (2%, w/v). All colonies obtained on plates were picked and purified by streaking onto the same medium at least three times. The subcultures purity, cell morphology, sporulation and motility were determined by phase-contrast microscopy (Nikon, Eclipse E400 light

microscope) of freshly prepared wet mounts. Colony morphology, Gram reaction, thermophilic growth and catalase activity of all isolates were tested using the commonly accepted methods [4].

Nucleic acid extraction and polymerase chain reaction (PCR). DNA was extracted from pure isolates using GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma) according to the manufacturer's recommendations and used as a template in the PCR assays. 16S rRNA genes were amplified using universal primer pairs 27f (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCA-3') and 1525r (5'-GAAAGGAGGAGATCCAGCC-3') (*Escherichia coli* numbering) [18].

PCR mixtures used for amplification of sequences contained 10 ng DNA, 5 µl 10×PCR buffer, 5 µl 10 mM dNTP (dATP, dGTP, dCTP and dTTP), 1 µl each primer (25 pmol/µl), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 µl *Taq* DNA polymerase, 2 µl 0.1% bovine serum albumin, and sterile water up to the final volume of 50 µl. PCR amplification was completed using a DNAEngine thermocycler (BIO RAD). First, the templates were denaturized for 3 min at 96°C, then 30 cycles of the following steps were completed: denaturation for 30 s at 96°C for, annealing for 30 s at 55°C, and extension at 2.5 min at 72°C. The 30 cycles were followed by a final 10 min extension at 72°C. PCR products were viewed under UV light after standard ethidium bromide gel electrophoresis.

Sequencing and phylogenetic analysis. PCR products were purified using GenElute™ PCR Clean-up Kit (Sigma) according to the manufacturer's recommendations, and were sequenced with 27f primer. Sequencing was performed on a ABI PRISM capillary sequencer according to the protocol of the ABI Prism BigDye Terminator kit (Perkin Elmer) [11].

A nucleotide BLAST search was performed in order to obtain information on the phylogenetically closest relative [7, 29]. The assembled 16S rRNA gene sequence was aligned with a representative set of 16S rRNA gene sequences obtained from the GenBank database. The sequences were edited and aligned with EditSeq and MegAlign of Lasergene software package (DNASTAR program). The alignments were initially done with the CLUSTAL W program option in MegAlign and were manually adjusted. Phylogenetic trees were generated using a neighbor-joining tree-building algorithm. Confidence in the branching points was determined by bootstrap analysis (1000 replicates) [15].

Results and Discussion. *Study sites and physical-ochemical analysis of geothermal waters.* The warm geothermal spring (Akhourik) is located at the coordinates of 40° 44' 34.04" N, 43° 46' 53.95" E, up to 1469 m high above the sea level, and has temperature in the range of 28.4-32.0°C, pH 6.2. The hot geothermal spring (Arzakan) is located at the coordinates of 40° 27' 36.10" N, 44° 36' 17.76" E, up to 1490 m high above the sea level, and has temperature of ≥ 44°C, pH 7.0-7.2. Despite the varying physical-chemical properties of the thermal springs used for the sampling, they belong to the category of hot springs from low-temperature fields and are characterized by neutral to alkaline pH and high concentration of dissolved minerals and gases. The hot spring is related to the hydrocarbonate sodium class of mineral springs (>20% is HCO₃⁻ and >20% is Na⁺), while the warm spring is related to the hydrocarbonate-sulphate sodium-magnesium class (>20% are HCO₃⁻ and SO₄²⁻, >20% are Na⁺ and Mg²⁺) [1].

Taxonomic affiliation and phylogenetic relationships of isolates. Collected water and adjacent sediment samples were analyzed to evaluate the total thermophilic aerobic endospore-forming bacterial abundance. In total, 14 aerobic thermophilic strains from the hot spring and 5 aerobic thermophilic strains from the warm one were isolated and identified. These strains were all rod-shaped (with exception of one, which was spherical), Gram-positive, endospore-forming and catalase-positive bacteria related to the phylum *Firmicutes*.

According to the Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [13], the phylogenetic classification schemes placed the two most prominent types of endospore-forming bacteria, clostridia and bacilli, in two different classes of the phylum *Firmicutes* - *Clostridia* (mainly anaerobes) and *Bacilli* (mainly aerobes). Class *Bacilli* includes the order *Bacillales* and 10 families (such as *Alicyclobacillaceae*, *Bacillaceae*, *Paenibacillaceae*, *Planococcaceae*, *Sporolactobacillaceae*, *Thermoactinomycetaceae*

and others). The family *Bacillaceae* is systematically and phylogenetically diverse taxon that is presently being re-evaluated. Molecular taxonomic methods, based on comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA gene sequences, have had a huge impact on the classification of these organisms, and the number of taxa, including thermophiles, has increased greatly [8, 16]. Currently, the *Bacillaceae* family has more than 40 new genera of the same level as *Bacillus* [13]. Considering this large number of novel endospore forming bacteria, the new term of *Bacillus*-like genera was introduced [12, 27]. Aerobic spore-forming thermophilic Gram-positive rods isolated from hot springs and related habitats are also taxonomically diverse. Thermophilic aerobic spore-forming bacteria having growth optima in the temperature range of 45 to >70°C are classified into the several genera, including *Brevibacillus*, *Alicyclobacillus*, *Anoxybacillus*, *Ureibacillus*, *Geobacillus*, *Bacillus*, and *Thermoactinomyces* [20].

The aim of the present study is to reveal the phylogenetic diversity of isolated thermophilic aerobic endospore-forming bacteria based on their 16S rRNA gene analysis. For this purpose, 16S rRNA genes from the extracted DNA of each isolate were successfully amplified by PCR and further sequenced. A homology search was carried out by using the basic BLASTN search program at the NCBI web site [28].

BLAST results for the isolates, based on 16S rRNA gene sequences for identification of the closest relatives in the GenBank database, are reported in Table 1. The correlation of the generated 16S rRNA gene sequences of the isolates with the ones stored in the GenBank database indicates that they all belong to *Clostridium*-*Bacillus* subphylum, group of *Bacillus*-like genera distributed in four families: *Bacillaceae* (genera *Bacillus* and *Geobacillus*), *Paenibacillaceae* (genus *Paenibacillus*), *Planococcaceae* (genus *Sporosarcina*) and *Thermoactinomycetaceae* (genus *Thermoactinomyces*). They are closely related with the members of eleven species of five genera: *Bacillus* (*B. pumilus*, *B. murimartini*, *B. licheniformis* and *B. simplex*), *Geobacillus* (*G. stearothermophilus*, *G. caldoxylosilyticus*, *G. thermodenitrificans* and *G. toebii*), *Sporosarcina* sp., *Paenibacillus* sp. and *Thermoactinomyces* sp.

Among the described species, the closest relatives of isolates ArzA-8, ArzA-33 and ArzA-33a were *G. toebii* with the sequence homology rates of 97, 99 and 99%, respectively. Successive analysis of the amplified 16S rRNA gene revealed phylogenetic relationship of isolate ArzA-7 to *Geobacillus* sp. (99%, 810 bp), ArzA-6 to *G. thermodenitrificans* (98%), ArzA-11 to *G. stearothermophilus* (99%) and ArzA-3 to *G. caldoxylosilyticus* (96%, 500 bp). Isolates ArzA-4 had identical 16S rDNA sequences with 99% identity to the 16S rDNA from *B. licheniformis*, while other isolates (ArzA-2, ArzA-10 and ArzA-13a) shared a significant similarity (96-98%) to *B. simplex*. The isolate ArzA-5 exhibited 98% similarity by 16S rRNA gene (955 bp) to *Paenibacillus* sp. Another one, ArzA-13, had the 16S rRNA gene (910 bp) highly similar to *Sporosarcina* sp. (98%).

The phylogenetic tree based on comparative studies between the 16S rDNA sequences (>700 bp) of isolates obtained from water and sediments of the Arzakan geothermal mineral spring, on one hand, and a selected number of members *Bacillus*, *Geobacillus*, *Sporosarcina* and *Paenibacillus* available in GenBank, on the other hand, is shown in Figure 1 (a). The phylogenetic tree confirms that isolates ArzA-6, ArzA-7, ArzA-8, ArzA-11, ArzA-33 and ArzA-33a constitute a part of the cluster within the thermophilic group of bacilli (genus *Geobacillus*). The resulting tree reveals two groups containing *Bacillus* species. The isolate ArzA-9 is related to the group, the members of which were closely similar to *B. simplex*, in spite of the fact that the sequences the isolate produced had the closest match with *Firmicutes* bacterium EU810844 (98%, 955 bp). Additional phenotypic and genotypic analyses are necessary to confirm taxonomic affiliation of this isolate. Each of the other two revealed clusters contained species from two different genera (*Paenibacillus* and *Sporosarcina*).

Table 1. BLAST results on bacterial 16S rRNA gene sequences for identification of the closest relatives in the GenBank database

Origin of isolates	Isolates (temperature of isolation, T°C)	Closest match Taxonomic affiliation, Phylotype accession no.	% of identity
Arzakan	ArzA-2 (50)	<i>B. simplex</i> AY833099	99
	ArzA-3 (65)	<i>G. caldxylosilyticus</i> FJ823099	96
	ArzA-4 (50)	<i>B. licheniformis</i> FJ435674	99
	ArzA-5 (50)	<i>Paenibacillus</i> sp. DQ497239	97
	ArzA-6 (65)	<i>G. thermodenitrificans</i> FJ823098	98
	ArzA-7 (65)	<i>Geobacillus</i> sp. EU093964	99
	ArzA-8 (65)	<i>G. toebii</i> GQ487459	97
	ArzA-9 (60)	<i>Firmicutes</i> bacterium EU810844	98
	ArzA-10 (60)	<i>B. simplex</i> GU048877	98
	ArzA-11 (60)	<i>G. stearothermophilus</i> AY608948	99
	ArzA-13 (50)	<i>Sporosarcina</i> sp. DQ227775	98
	ArzA-13a* (50)	<i>B. simplex</i> AY833099	96
	ArzA-33 (65)	<i>G. toebii</i> AB116120	99
	ArzA-33a* (65)	<i>G. toebii</i> AB116120	99
Akhourik	AkhA-1 (50)	<i>B. pumilus</i> FJ237277	99
	AkhA-12 (60)	<i>Thermoactinomyces</i> sp. AB362275	97
	AkhA-14 (50)	<i>B. licheniformis</i> EF427891	97
	AkhA-14a* (50)	Uncultured bacterium EU773370	97
	AkhA-15 (50)	<i>B. murimartini</i> AJ316316	99

*Isolates designated as Arz13 and Arz13a, Arz33 and Arz33a, Arz14 and Arz14a were obtained from the same enrichments, but from different plates.

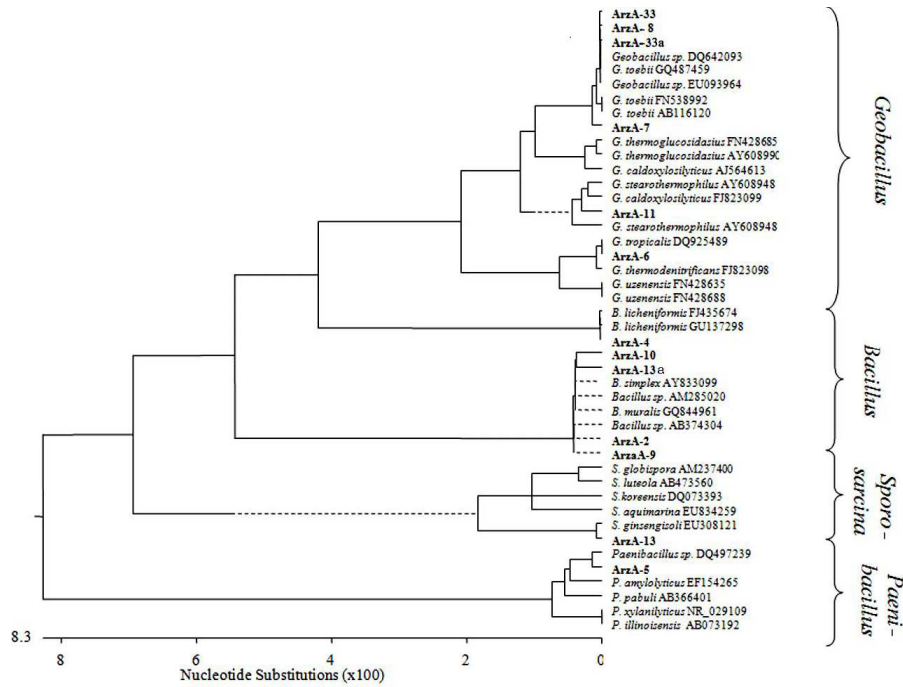
As shown in Table 1, the majority of isolates from the warm spring shared significant similarity (97-99%) to *Bacillus* by their 16S rDNA sequences. The 16S rDNA sequence of isolate ArzA-12 was identical (97%, 815 bp) to the sequences of *Thermoactinomyces* sp.

The phylogenetic tree built to demonstrate the relationship between the retrieved 16S rDNA sequences for the Akhourik spring and their closest relatives from GenBank is shown in Figure 1 (b). According to the presented dendrogram, the genus *Bacillus* appears heterogeneous. The four bacilli isolates are distributed among the three distinct groups (with the closest relatives of *B. licheniformis*, *B. pumilus*, and *B. murimartini*, respectively). A separate group contains AkhA-14a. The 16S rDNA sequence of isolate AkhA-14a was affiliated (97%, 725 bp) with uncultured representatives of the Domain *Bacteria*, but showed less than 95% similarity with *Bacillus* sp. This suggests that isolate AkhA-14a may appear to be a novel bacterial species.

As shown on the dendrogram in Figure 1 (b), there is a separate cluster that contains representatives of thermoactinomyces. According to earlier reports based on 16S rRNA gene sequence analysis [26], *Thermoactinomyces* is more closely related to *Bacillus* species than to actinomycetes. *Thermoactinomyces* species produce endospores like bacilli, are aerobic, Gram-positive and thermotolerant. Yoon and Park [26] suggest that genus *Thermoactinomyces* should be placed within the family *Bacillaceae*.

Therefore, thermophilic microflora in the Akhourik mineral spring is taxonomically less diverse than in the Arzakan spring. All isolates detected in the warm spring were thermotolerant ones and included representatives of only two genera - *Bacillus* and *Thermoactinomyces* – with prevailing content of *Bacillus* composing 80% of the isolates in total. *Bacillus* and *Geobacillus* with their 5 and 7 isolates, respectively, were the predominant genera in the hot spring.

a.



b.

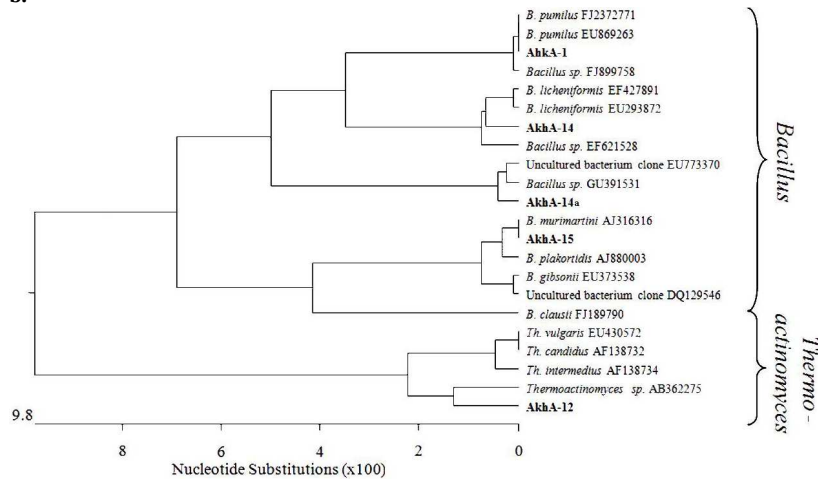


Fig. 1. Phylogenetic tree based on the comparative studies between 16S rDNA sequences of the isolates obtained from Arzak (a) and Akhourik (b) geothermal mineral springs, on one hand, and selected members of *Bacillus*, *Geobacillus*, *Sporosarcina*, *Paenibacillus* and *Thermoactinomyces* available in GenBank, on the other hand. Scale bar corresponds to one nucleotide substitution per 100 nucleotides.

From the metabolic point of view, genus *Geobacillus* includes chemoorganotrophic, aerobic or facultative aerobic (oxygen as the electron acceptor is in some species replaceable by nitrate) obligatory thermophiles [20, 27]. In total, 50% of the isolates detected in the hot spring samples are most closely related to members of the genus *Geobacillus*, which are known to thrive in similar habitats [10, 27]. Representatives of *G. toebii* are the most distributed obligate thermophiles in the studied hot spring. Abundance of geobacilli is in agreement with temperature regime of the studied thermal spring ($\geq 44^{\circ}\text{C}$). All isolates from the hot spring that belonged to the genus *Bacillus* were thermotolerant microorganisms among which *B. simplex* appeared as the dominating species.

Although representatives of the genera *Paenibacillus*, *Thermoactinomyces* and *Sporosarcina* are commonly considered the species most frequently isolated from similar habitats [12, 23, 25, 26], both springs sampled in this study demonstrated significantly lower content of these species.

As part of microbial communities, thermophilic endospore-forming bacteria presumably have significant contribution in forming the composition of mineral waters, and promote normal course of geochemical circulations under extreme temperature conditions. Moreover, apart from the thermal conditions, abiotic factors such as pH, dissolved gases (H_2 , CO_2 , H_2S , CH_4) and high mineralization could act as limiting factors for microbial diversity and biomass [22]. Recent studies have also highlighted that other factors such as biogeography and geological history can also be important in determining the thermophilic diversity in geothermal springs [24].

The results obtained in this study show the importance of further investigation of the phylogenetic diversity of microbes in geothermal springs to discover and isolate new thermophilic species.

Acknowledgements

The part of this research was carried out at the Bergen University (Bergen, Norway) in framework of FEMS Research Fellowship-2008-2. Invaluable assistance of Prof. N.K. Birkeland and Prof. Yu.G. Popov and technical support of Ms. M. Madsen is to be highly emphasized.

REFERENCES

1. Геология Армянской ССР, IX. Минеральные воды. Ереван, Изд. АН Арм. ССР, 521, 1969.
2. Жизнь микробов в экстремальных условиях. Под ред. Д. Кашнера. М.: Мир, 519, 1981.
3. Паносян О.А. Термофильные бациллы термальных источников Армении. Биол. журн. Армении, 60, 3, 19-24, 2008.
4. Практикум по микробиологии. Под ред. Непрусова А.И. М., Изд-во АН РФ, 603, 2005.
5. Access to Biodiversity and New Genes from Thermophiles by Special Enrichment Methods. PhD thesis Cedric F.V. Hobel, University of Iceland, Reykjavik, 96, 2004.
6. Afrikian E.G., Khachaturian A.A., Avakian Z.G. Ecology of some groups of extremophilic bacilli in soils. 5th Int. Symp. Microbiol. Ecol. (ISMES), 54, 1990.
7. Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucl. Acids Res., 25, 3389-3402, 1997.
8. Ash C., Farrow A.E., Wallbanks S., Collins M.D. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal DNA sequences. Lett. Appl. Microbiol., 13, 202-206, 1991.
9. Charlier D., Droogmans L. Microbial life at high temperature, the challenges, the strategies. Cell Mol. Life Sci., 62, 2974-2984, 2005.

10. Coleri A., Cokmus C., Ozcan B., Akkoc N., Akcelik M. Isolation of α -glucosidase-producing thermophilic bacilli from hot springs of Turkey. *Microbiology*, 78, 1, 56-66, 2009.
11. Dahle H., Garshol F., Madsen M., Birkeland N.-K. Microbial community structure analysis of produced water from a high-temperature North Sea oil-field. *Antonie van Leeuwenhoek*, 93, 37-49, 2008.
12. Derekova A., Mandeva R., Kambourova M. Phylogenetic diversity of thermophilic carbohydrate degrading bacilli from Bulgarian hot springs. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 24, 1697-1702, 2008.
13. Garrity G.M., Lilburn T.G., Cole J.T., Harrison S.H., Euzéby J., Tindall B.J. Taxonomic Outline of the Bacteria and Archaea. Release 7.7 Part 9-The Bacteria: Phylum Firmicutes. Class *Bacilli*. <http://www.bergeysoutline>, March 2007.
14. Gordon R.E., Haynes W.C., Pang C.H.W. The Genus *Bacillus*. *Agricult. Handbook*. Washington: D.C., 1973.
15. Hall B.G. *Phylogenetic trees made easy: A how-to manual*, second edition. Sinauer associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts, USA, 221, 2004.
16. Joung K.B., Cote J.C. Evaluation of ribosomal RNA gene restriction patterns for the classification of *Bacillus* species and related genera. *J. Appl. Microbiol.*, 92, 97-108, 2002.
17. Kristjansson J.K., Stetter K. Thermophilic bacteria. In: Kristjansson J.K. (ed.) *Thermophilic bacteria*. CRC Press. Inc., Boca Raton, 1992.
18. Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E., Goodfellow M. (eds) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 115-148, 1991.
19. Lau M.C.Y., Aitchison J.C., Pointing S.B. Bacterial community composition in thermophilic microbial mats from five hot springs in central Tibet. *Extremophiles*, 13, 139-149, 2009.
20. Nazina T.N., Tourova T.P., Poltarau A.B., Novikova E.V., Grigoryan A.A., Ivanova A.E., Lysenko A.M., Petrunyaka V.V., Osipov G.A., Belyaev S.S., Ivanov M.V. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51, 433-446, 2001.
21. Priest T.G., Goodfellow M., Todd C. A numerical classification of the genus *Bacillus*. *J. Gen. Microbiol.*, 134, 1847-1882, 1988.
22. Purcell D., Sompong U., Lau C.Y., Barraclough T.G., Peerapornpisal Y., Pointing S.B. The effects of temperature, pH and sulphide on community structure of hyperthermophilic streamers in hot springs of northern Thailand. *FEMS Microbiol. Ecol.* 60, 456-466, 2007.
23. Sharp R.J., Riley P.W. White D. Heterotrophic thermophilic bacilli. In: Kristjansson J.K. (ed.) *Thermophilic bacteria*. CRC Press. Inc., Boca Raton 1992.
24. Takacs-Vesbach C., Mitchell K., Jakson-Weaver O., Reysenbach A-L. Volcanic calderas delineate biogeographic provinces among Yellowstone thermophiles. *Environ. Microbiol.*, 10, 1681-1689, 2008.
25. Xu D., Cote J.Ch. Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from comparison of 3' end 16S rDNA and 5' end 16S-23S ITS nucleotide sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53, 695-704, 2003.
26. Yoon J.H. and Park Y.H. Phylogenetic analysis of the genus *Thermoactinomyces* based on 16S rDNA sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50, 1081-1086, 2000.
27. Zeigler D.R. The Genus *Geobacillus*. Introduction and strain catalog. In: Zeigler D.R. (ed.) *Catalog of strains*, vol. 3, 7th edn. *Bacillus* genetic Stock Center, The Ohio State University, USA, 2001.
28. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (July 17, 2010).

Received 26.07.2010



ВЛИЯНИЕ ВНЕШНЕГО ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКОГО ПОЛЯ НА ТЕНИ ЭРИТРОЦИТОВ

Г.Г. АРЦРУНИ, Г.В. СААКЯН

Ереванский государственный медицинский университет, НИЦ,
лаборатория биохимических и биофизических исследований

Исследовано влияние внешнего электростатического поля (ЭСП) напряженностью 200 кВ/м на параметры связывания флуоресцентного зонда АНС с тенями эритроцитов. Показано, что при *in vivo* воздействии ЭСП константа скорости связывания АНС с тенями эритроцитов возрастает с одновременным снижением количества центров связывания. В экспериментах *in vitro*, во время которого связывание АНС с тенями эритроцитов происходило при непосредственном влиянии ЭСП, константа скорости связывания АНС с тенями эритроцитов не меняется, а количество центров связывания снижается. Когда инкубация с АНС проводилась после предварительного воздействия поля на тени эритроцитов, эффектов не было выявлено.

Электростатическое поле - тени эритроцитов - АНС

Ուսումնասիրվել է 200 կՎ/մ լարվածությամբ արտաքին էլեկտրաստատիկ դաշտի (ԷՍԴ) ազդեցությունը էրիթրոցիտների ստվերների հետ ֆլուորեսցենտային զոնդ ԱՆՍ-ի կապման պարամետրերի վրա: Ցույց է տրվել, որ *in vivo* ազդեցության արդյունքում էրիթրոցիտների ստվերների հետ ԱՆՍ-ի կապման արագության հաստատունը կապման կենտրոնների քանակի նվազմանը զուգահեռ աճում է: *In vitro* հետազոտությունների ժամանակ, երբ էրիթրոցիտների ստվերների հետ ԱՆՍ-ի կապումը իրականացվում է դաշտի անմիջական ազդեցությամբ, ԱՆՍ-ի կապման արագության հաստատունը չի փոխվում, իսկ կապման կենտրոնների քանակը նվազում է: Երբ ԱՆՍ-ի հետ էրիթրոցիտների ստվերների ինկուբացիան իրականացվում է վերջիններս նախապես դաշտի ազդեցությանը ենթարկելուց հետո, որևէ էֆեկտ չի գրանցվում:

Էլեկտրաստատիկ դաշտ - էրիթրոցիտների ստվերներ - ԱՆՍ

The influence of 200 kV/m external electrostatic field (ESF) on the binding parameters of fluorescent probe ANS with ghosts of erythrocytes was investigated. It was shown that *in vivo* influence of ESF led to the increase of the speed constant of ANS binding with ghosts in parallel with decrease of the amount of binding centers. In the case of *in vitro* experiments, when incubation of ANS with ghosts was released under the direct effect of ESF, the speed constant of ANS binding was not changed, while the amount of binding centers decreased. When the incubation of ANS with ghosts was accompanied after their treatment with field, any effect was not observed.

Electrostatic field - ghosts of erythrocytes – ANS

Ранее нами было показано, что первичный механизм биологической активности внешнего электростатического поля (ЭСП) в основном обуславливается физическими процессами на границе сред с различной проводимостью [1]. Плазматическая мембрана является системой с явно выраженными границами компонентов, имеющих разную проводимость.

Показано, что ЭСП существенно влияет на структурно-функциональное состояние биологических мембран [2, 5, 6, 7, 13, 15, 16, 17]. Однако в доступной нам литературе мы не встретили работ, свидетельствующих о тех или иных конкретных структурных перестройках в биологических мембранах после воздействия ЭСП. Представляемая работа является попыткой восполнить этот пробел.

Параметры связывания флуоресцентного зонда 1-анилинонафталин-8-сульфоната (АНС) с мембраной эритроцита служит индикатором для оценки молекулярных перестроек в структуре мембраны [9, 14]. Целью данной работы является исследование *in vivo* и *in vitro* влияния ЭСП на параметры связывания АНС с тенями эритроцитов.

Материал и методика. В экспериментах использованы белые беспородные крысы массой 150-200 г. ЭСП создавалось при помощи установки конденсаторного типа, описание которой дано в работе [3]. Опытные животные подвергались воздействию ЭСП напряженностью 200 кВ/м. Контрольные и экспериментальные животные декапитировались. Из крови по стандартной методике извлекались эритроциты, выделялись мембраны и собирались тени эритроцитов по методу Доджа [8] с небольшой модификацией - эритроциты промывались физиологическим раствором, что позволяло увеличить выход мембран.

Исследование теней эритроцитов проводили методом флуоресцентного зонда, в качестве которого использовали АНС, который имеет единичный отрицательный заряд и располагается в наиболее функционально активном поверхностном слое мембран [9]. Молекулы зонда возбуждались при (360 нм, флуоресценцию регистрировали при (450 нм. Исследования проводили на спектрофлуорометре Hitachi MPF-4 (Япония).

Флуоресценцию измеряли в условиях постоянной концентрации мембранного белка (0,3 мг/мл) при титровании АНС (5-100 мкМ) и постоянной концентрации АНС (5 мкМ) различными концентрациями мембран (0,1-0,6 мг/мл). Полученные данные выражали в обратных координатах и строили графики по Клотцу (10). Константу скорости реакции (K_c) и количество центров связывания зонда рассчитывали по формуле Скэтчарда (12). Белок определяли по Лоури (11). Для каждой точки измерения использовали тени эритроцитов, выделенные от трех животных. Каждая расчетная точка бралась как средняя от 7 измерений. Статистическую обработку данных проводили с помощью критерия Стьюдента.

В *in vivo* экспериментах исследовали тени эритроцитов крыс, предварительно подвергнутых однократному воздействию ЭСП. Для *in vitro* опытов тени эритроцитов, полученные из крови intactных животных, делили на три части. Одна часть служила контролем. Вторую часть после 20-минутного воздействия поля напряженностью 200 кВ/м инкубировали с АНС в течение 20 мин (*in vitro* I). Третью часть во время 20-минутной инкубации АНС подвергали воздействию ЭСП той же напряженности (*in vitro* II).

Результаты и обсуждение. На рис. 1 и 2 приведены флуорометрические кривые титрования теней эритроцитов зондом АНС (а) и титрования АНС с тенями эритроцитов (б) в обратных координатах после воздействия ЭСП.

На основании флуорометрических кривых были рассчитаны константы скорости связывания АНС с тенями эритроцитов и количество центров связывания (табл. 1).

Как следует из табл.1, при *in vivo* воздействии ЭСП константа скорости связывания АНС с тенями эритроцитов возрастает на 94% с одновременным понижением числа центров связывания на 66,97%. Эти изменения исследуемых параметров говорят о том, что воздействие ЭСП привело к таким межмолекулярным перестройкам в поверхностном слое эритроцитарных теней, которые, уменьшая количество центров связывания, изменяют их заряд таким образом, что увеличивается константа скорости реакции. Если принять во внимание, что АНС связывается в поверхностном слое мембраны на местах контакта белок-липид (4, 9, 14), то можно предположить, что фиксированные изменения являются следствием изменений взаимного расположения этих молекул. Эти изменения могут быть обусловлены перестройками липидного обмена в мембранах эритроцитов [2, 13], а так-

же изменением поверхностного заряда эритроцитов при воздействии ЭСП [6, 7], а могут быть и результатом поляризации фосфолипидов наружного слоя мембраны. В пользу последнего предположения свидетельствуют результаты, полученные в экспериментах *iv vitro* II, во время которого связывание АНС с тенями эритро-цитов происходило при непосредственном влиянии ЭСП. Согласно полученным данным, константа скорости связывания АНС с тенями эритроцитов не меняется, а количество центров связывания снижается на 81,6%, то есть во время воз-действия поля происходят межмолекулярные перестройки вне зависи-мости от обменных процессов, которые могут являться следствием поляризации белков и липидов, что может привести к их пространственной переориентации. Стоит обра-тить внимание на то, что в данном случае понижение количества цент-ров связывания практически не изменило константу скорости реакции связывания, что свидетельствует об изменении зарядов центров связывания. Это еще раз под-тверждает наше предположение, что при *in vitro* воздействии первичным механиз-мом наблюдаемых изменений является поляризация биологических макромолекул на поверхностном слое мембраны.

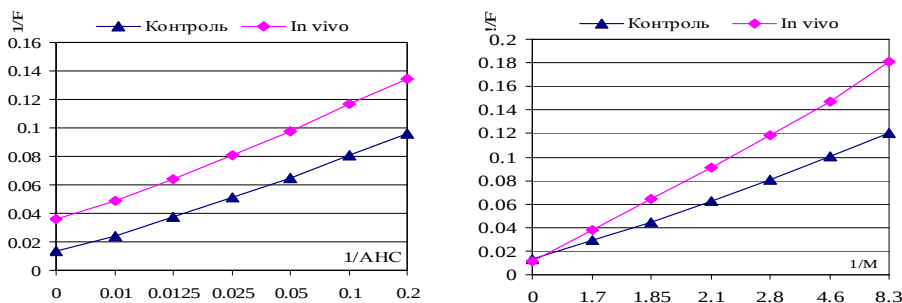


Рис. 1. Флюорометрические кривые титрования теней эритроцитов зондом АНС (а) и титрования АНС с тенями эритроцитов (б) в обратных координатах после одночасового *in vivo* воздействия ЭСП напряженностью 200 кВ/м:
 I/F – интенсивность флюоресценции в относительных единицах,
 АНС – концентрация зонда, мкМ,
 М – концентрация белка теней эритроцитов, мг/мл

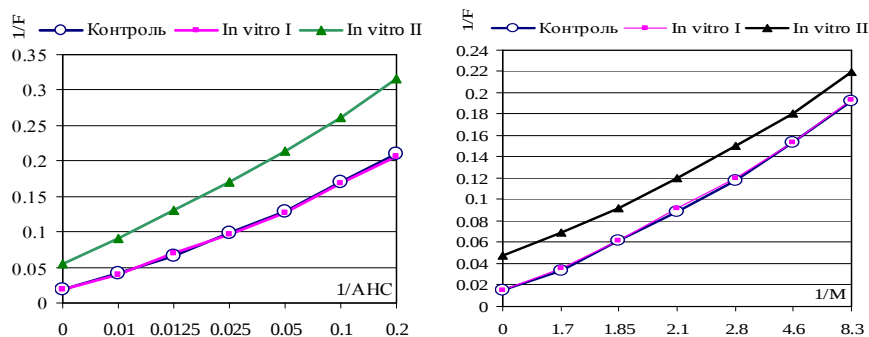


Рис. 2. Флюорометрические кривые титрования теней эритроцитов зондом АНС (а) и титрования АНС с тенями эритроцитов (б) в обратных координатах после 20-минутного *in vitro* воздействия ЭСП напряженностью 200 кВ/м

Обозначения см. на рис.1.

Таблица 1. Константа скорости связывания (K_c) и количество центров связывания (N) АНС с тениями эритроцитов при *in vitro* и *in vivo* воздействии ЭСП напряженностью 200 кВ/м
* $p=0,086$

Параметр	Контроль	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i> I	<i>In vitro</i> II
$K_c, \times 10^4 \text{ M}^{-1}$	$2,1 \pm 0,69$ n= 21	$4,08 \pm 0,086^*$ n= 21	$1,8 \pm 0,2$ n= 21	$2,2 \pm 0,18$ n= 21
$N, \times 10^{-9} \text{ M/мг}$ белка	$36,06 \pm 5,27$ n= 21	$11,91 \pm 1,72^{**}$ n= 21	$37,83 \pm 3,31$ n= 21	$6,63 \pm 1,18^{***}$ n= 21

** $p=0,0002$ *** $p=0,00002$

Результаты экспериментов по *in vitro* I, во время которого инкубация с АНС проводилась после предварительного воздействия ЭСП на тени эритроцитов, не выявили никаких эффектов. Это можно объяснить тем обстоятельством, что время релаксации молекул достаточно мало для фиксации возможного эффекта поляризации, а остаточная поляризация незначительна.

Таким образом, межмолекулярные перестройки в поверхностном слое мембран, вследствие поляризации биологических макромолекул во время воздействия ЭСП, могут явиться первопричиной множества изменений в мембранах после воздействия поля, описанных ранее в работах 2, 5, 6, 7, 13, 15, 16, 17.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арцруни Г. Механизмы биологической активности электростатических полей. Мед. наука Армении, XL, 3, с. 70-80, 2000.
2. Арцруни Г. Качественно-количественный состав и деацилирование фосфолипидов мембран эритроцитов после воздействия внешнего электростатического поля. Глобус науки, 1, 1, с. 33-37, 2001.
3. Арцруни Г.Г. Камера для изучения действия ЭСП на мелкие лабораторные животные. Удост. на рац. предложение, № 134, 1983.
4. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. Флюоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М.: Наука. 1980.
5. Параніч А., Ромоданова Е., Пашиневка В. Зміна жеских фізіологічних парметрів в організмі зрихих шурих під впливом електростатичного поля. Физиол. ж., Киев, 39, 4, с. 94 – 97, 1993.
6. Погосян Г., Саакян Г., Арцруни Г. Влияние электростатического поля на электрокинетический потенциал эритроцитов. Биолог. журнал Армении, 1-2, с. 136-138, 2007.
7. Change S. Electric-field-induced volume and membrane ionic permeability changes of red blood cells. IEEE transactions on biomedical engineering, 40, 10, 1054-1059, 1993.
8. Dodge J.T., Mitchell C., Hanahan D. The preparation and hemical characteristics of hemoglobin - free shosts of human erythrocyts. Arch. Biochem. and Biophys. 100, 1, 119-130, 1980.
9. Horie T., Sugiyama Y., Awazu S., Hanano M. 1-Anilino-8-naphthalene sulfonate binding site on human erythrocyte membrane using fluorescence lifetime and polarization. J Pharmacobiodyn. Feb; 5, 2, 73-80, 1982.
10. Klotz I. Chem. Revs, 41, p. 373, 1974.
11. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randal R. Protein measurements with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 1, 265-275, 1951.
12. Sckatchard G. Ann. N.Y. Acad. Sci., 51, p. 660, 1949.

13. *Starke-Peterkovic T., Turner N., Else P. L., Clarke R. J.* Electric field strength of membrane lipids from vertebrate species: membrane lipid composition and Na⁺-K⁺-ATPase molecular activity. *Am. J. Physiol.*, 288:663-670, 2005.
14. *Slavik, J.*, Anilinonaphtalene sulphonate as a probe of membrane composition and function, 1982.
15. *Vasilkoski Z.* The effect of electric fields on lipid membranes. *Biological Physics*, 1, 15-22, 2006.
16. *Vassu T., Fologea D., Csutak O., Smarandache D., Sasarman E., Stolica I., Soare S.* Secondary Effects of Electroporation with bipolar electric pulses: Electrostimulation. *Roum. Biotechnol. Lett.*, 9, 1, 1541-1544, 2004.
17. *Wilkea N., Maggio B.* Effect of externally applied electrostatic fields on the surface topography of ceramide-enriched domains in mixed monolayers with sphingomyelin. *Biophysical Chemistry*, 122, 1, 36-42, 2006.

Поступила 12.10.2010.



Биол. журн. Армении, 4 (62), 2010

ОСОБЕННОСТИ МЕЖЭКОСИСТЕМНЫХ СВЯЗЕЙ В АРАГАЦСКОМ ГОРНОМ МАССИВЕ

А.Г. САКОЯН, Р.Г. РЕВАЗЯН, Л.А. АРАРАТЯН,
Э.А. САФРАЗБЕКЯН, М.Г. АВЕТИСЯН

Центр Эколого-ноосферных исследований НАН РА
E-mail: eco-centr@mail.ru

Рассматриваются вопросы межэкосистемных связей между различными экосистемами - как близкими, так и пространственно более удаленными. Специфика трансформации и дальнейшего развития послелесных почв, близких экосистем обусловлена особенностями миграционных процессов, свойственных данному географическому поясу горной системы. Здесь имело место развитие элювиальных процессов, обуславливающих более высокую мобилизацию азотсодержащей органики и минеральных веществ в межэкосистемных связях.

Изучение межэкосистемных связей между удаленными экосистемами по вертикальной поясности с помощью водно-миграционного потока веществ, включающего различные генетические категории ландшафтных вод: атмосферные осадки - внутрипочвенный сток (лизиметрические воды) - водотоки - речной сток, показало, что речные воды практически полностью преемствуют степень ионной и общей минерализации, гидрохимический тип лизиметрических вод, сформировавшихся в почвенном профиле.

Миграция химических элементов - внутрипочвенный сток - межэкосистемные связи - лесной и луговой ценозы

Քննարկվում են միջէկոհամակարգային կապերին վերաբերող հարցեր՝ կապված ինչպես մոտիկ, այնպես էլ տարածությամբ իրարից հեռու տարբեր էկոհամակարգերի միջև փոխադարձ կապերի միաժամանակյա ուսումնասիրման և հաշվառման հետ:

Միմյանց մոտ գտնվող էկոհամակարգերի (անտառային և հետանտառային ցենոզների) միջհամակարգային կապերի յուրահատկությունը պայմանավորված է լեռնային համակարգի տվյալ աշխարհագրական գոտուն բնորոշ միգրացիոն պրոցեսների առանձնահատկություններով: Այստեղ տեղի է ունենում էյուվիալ պրոցեսների զարգացում, որը պայմանավորում է ազոտ պարունակող օրգանական և հանքային նյութերի բարձր համալրումը:

Միջհամակարգային կապերի ուսումնասիրությունը՝ կատարված իրարից հեռու էկոհամակարգերի միջև նյութերի ջրամիգրացիոն հոսքի վերլուծության օգնությամբ (որը ներառում է իր մեջ ջրերի տարբեր գենետիկական կատեգորիաներ. մթնոլորտային տեղումներ (ներհողային հոսք), (լիզիմետրիկ ջրեր) (ջրահոսքեր (գետային հոսք, ցույց տվեց, որ գետաջրերը գրեթե լիովին ժառանգում են հողային պրոֆիլում կազմավորված իոնային և ընդհանուր հանքայնացման աստիճանը, հիդրոքլիմիական տիպը, ինչպես նաև բնական ջրերի հիմնական աղային կազմի իոնների հարաբերությունների տիպը:

Քիմիական տարրերի միգրացիա — ներհողային հոսք — միջէկոհամակարգային կապեր — անտառային և մարգագետնային համակեցություններ

The article deals with issues of inter-ecosystem bonds connected with synchronous studies and consideration of interrelations of different ecosystems spatially located closely to and distantly from each other. A specificity of transformation of closely located ecosystems (forest and after-forest coenoses) is predetermined by peculiarities of migration processes typical of the given geographic belt of the mountain system. There eluvial processes used to develop stipulating higher mobilization of nitrogen-containing organic matter and mineral substances in inter-ecosystem bonds.

Investigation of inter-ecosystem bonds of distant ecosystems by vertical zones with the help of water-migration flow of substances (that includes diverse genetic categories of landscape waters- atmospheric precipitation, in-soil runoff (lysimetric waters) – water currents – river runoff) indicated that practically river waters fully inherit the level of ionic and common mineralization, a hydrochemical type of lysimetric waters formed on soil profile as well as a type of correlation of ions of basic salt composition of natural waters.

Migration of chemical elements - in-soil runoff - inter-ecosystem bonds – forest and meadow coenoses

В настоящее время исследования экологической направленности в основном развертываются внутри экосистем, между их живыми и косными компонентами. Задача эта для охраны окружающей среды, естественно, имеет первостепенное значение, однако она не должна препятствовать одновременному изучению и учету взаимосвязей между различными экосистемами - как близкими, так и более пространственно удаленными. Поэтому изучение этих взаимоотношений имеет прямое касательство к наиболее острым проблемам – устойчивого развития и первичной биологической продуктивности.

Одним из важнейших положений для экосистем следует признать изучение межэкосистемных связей, поскольку природа любой экосистемы определяется не только особенностями структуры и работы составляющих его компонентов, но в неменьшей степени и воздействием окружающих соседних экосистем. Поскольку с помощью водной и воздушной миграции происходит пространственный перенос различных растительных и твердых минеральных частиц, выдуваемых или смываемых с почвой [4]. Особенно существенна межэкосистемная миграция веществ, связанная с водным потоком, который выщелачивает значительную массу веществ, используемых другими экосистемами [2,8]. С этих позиций актуальным является изучение миграции химических элементов в системе атмосферные осадки – основные генетические категории природных вод (внутрипочвенный сток, водо-токи, речная вода) для горных экосистем Арагацского массива по всему высотному диапазону (3270-1128 м абсолютной высоты), а также в системе подстилка – почва – инфильтрационные воды в лесных и луговых ценозах луго-степного пояса, что позволит дать количественную характеристику миграционных процессов, определяющих степень использования почвенных ресурсов и экологических последствий, нарушающих экосистемные связи. Поэтому без изучения и оценки межэкосистемных связей не может быть правильно исследована и расшифрована внутриэкосистемная миграция, которая имеет прямое отношение к наиболее острым экологическим проблемам.

Целью настоящей работы являлось комплексное эколого-геохимическое исследование межэкосистемных связей в горном массиве, предусматривающее изучение не только основных компонентов экосистемы, но и миграционных потоков элементов, диагностирующих наиболее важные процессы функциониро-

вания экосистем. Они включают характеристику особенностей миграционных процессов как между близкими, так и пространственно более удаленными экосистемами, а также трансформации химического состава объектов исследования под воздействием антропогенных и природных факторов.

Материал и методика. С целью исследования межэкосистемных связей Арагацкого горного массива в целом (альпийский, лугостепной пояса) определяли химический состав атмосферных осадков и основных генетических категорий природных вод (внутрипочвенный сток, водотоки и речная вода). Изучение внутрипочвенного стока проводилось лизиметрическим методом. Плосковрезные лизиметры были установлены под горизонтом почв (0-50 см), при этом не нарушая естественного растительного покрова и подстилки и в наименьшей степени деформируя строение и сложение почвы.

Межэкосистемные связи изучали также на примере 2-х почвенных типов: лугово-степного и лесного коричневого, распространенных в лугостепном географическом поясе. Все пробные площадки расположены в лугостепном поясе с однотипными климатическими условиями. Исследовали почвы, водные вытяжки из почв и подстилки лугостепного пояса Арагацкого горного массива. Изучаемая территория представляет собой предел формирования лесной экосистемы, граничащей с луговым сообществом. Лесной ценоз представлен смешанным лесом, и его древостой относительно низкорослый; для исследуемых лесных почв характерна мощная подстилка. Водные вытяжки получены при соотношении твердая фаза – вода 1:10 для подстилок и 1:5 для минеральных горизонтов почв. В вытяжках определен ионный состав, pH, редокс-потенциал (Eh) и общее содержание углерода (C org) по общепринятым методикам.

Результаты и обсуждение. В настоящей работе мы попытались дать анализ особенностей миграции химических элементов в луговых и лесных ценозах одного географического пояса (лугостепного), а также миграции элементов по всему высотному диапазону (3270-1127 м абсолютной высоты) в системе атмосферные осадки – внутрипочвенный сток – речная вода, подходя к ним с позиций меж-экосистемных связей.

Известно, что происходящие в экосистемах биогеохимические обменные процессы способствуют усилению способности почвенного раствора и инфильтрующихся через почву вод к агрессивным действиям по отношению к минералам. При этом оно происходит вследствие увеличения CO₂ в почвенном растворе, в основном за счет биохимического распада растительных остатков – подстилки [6].

Одним из важнейших этапов жизнедеятельности травяных и лесных ценозов следует признать ежегодное образование слоя отмирающих остатков – подстилки в разной степени разложения в почве или на ее поверхности. Этот слой является не только хранилищем химических элементов – питательных веществ, но и одним из важных структурных элементов вышеуказанных ценозов. Они являются источником водорастворимых органических веществ и основной зоной накопления химических элементов. В водных вытяжках из подстилок преобладают водорастворимые органические и химические вещества. При этом водорастворимые органические вещества разного состава, как известно, преимущественно электронейтральны, что ограничивает их сорбцию почвенными частицами и способствуют свободной миграции в ландшафте [9].

Изучение процессов трансформации химического состава подстилки, показывает динамику изменения его в лесном и луговом ценозах (табл.1). В лесной подстилке оказывается гораздо больше K, P, Ca, Mg, N, чем в подстилке луга. При этом лесная подстилка отличается значительно высоким, чем в луговом ценозе, уровнем общего содержания углерода. Эти факторы способствуют, в частности, переходу от кислой реакции, свойственной лесным ценозам, к щелочной в луговых ценозах. Возможно, менее кислая реакция и большее содержание кальция в подстилке создают более благоприятные условия для жизнедеятельности микроорганизмов, что усиливает их способность полнее разлагать органические остатки [1].

Органическое вещество, с которым связаны окислительно-восстановительные условия, является одним из важнейших компонентов почвы, причем с одной стороны, оно выступает как источник энергии и пищи, обеспечивая деятельность микробных ценозов и определяя тем самым интенсивность окислительно-восстановительных процессов в почве, с другой – органическое вещество, обладая довольно сильно выраженной восстановительной способностью [3], участвует в этих реакциях.

По своему биохимическому составу почвенная азотсодержащая органика очень неоднородна, значительная часть ее входит в состав стойких и инертных в химическом отношении соединений [7]. Поэтому часть азота является как бы законсервированной на длительный период времени и не принимает участия в биогеохимической цикличности [5]. Другая часть азотного фонда менее сложного химического состава, обладает способностью в естественных условиях среды подвергаться гидролитическому расщеплению. Эту часть рассматриваем как непосредственный источник образования минеральных форм азота.

Таблица 1. Сравнительная характеристика состава водных вытяжек из подстилок и почв лесных и луговых ценозов в лугостепном поясе, мг/л (среднее за 2005-2008гг)

Водная вытяжка	pH	C орг.	Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	Na ⁺	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	PO ₄ ³⁻
Лесной ценоз (смешанный лес)									
Из подстилки	-	253,7	370,0	330,0	480,0	210,0	89,9	450,0	180,0
Из лесной коричневой почвы	5,7	92,4	93,0	60,0	43,0	61,0	1,5	4,2	0,96
Луговой ценоз (послесесной участок, 20лет после вырубki леса) сенокос									
Из подстилки	-	224,5	340,0	310,0	185,0	210,0	56,0	142,0	110,0
Из лугово-степной почвы	5,7	78,6	79,0	60,0	25,7	55,6	1,0	3,4	0,89
Луговой ценоз, сенокос (контроль)									
Из подстилки	-	128,3	195,0	200,0	110,0	152,0	22,0	47,0	47,9
Из лугово-степной почвы	7,4	48,9	50,0	35,0	15,6	32,0	0,96	2,4	0,63

Из табл. 1 видно, что общее содержание водорастворимых органических веществ в подстилках лесного ценоза заметно отличается от лугового и превышает его в 2 раза. Содержание углерода в водной вытяжке из лугово-степной почвы (послесесной участок) по сравнению с лесной коричневой почвой в 1,2 раза уменьшается, тогда как по сравнению с луговым ценозом - в 1,9 раз.

Содержание углерода в водах верхнего горизонта лесной коричневой почвы меньше по сравнению с подстилкой в 2,7 раз. Аналогичная картина отмечается и для лугово-степной почвы. Различия в содержании воднорастворимых органических веществ ценозов связаны с особенностями биогеохимической цикличности углерода, которая характеризуется объемом и структурой фитомассы и ее продуктивностью, составом опада и др. факторами.

Разница в содержании ионов Ca, Mg, Na, NO₂, NO₃ и PO₄ между лесным ценозом и послелесным участком небольшая; что касается контрольного участка, то здесь концентрации ионов в водных вытяжках резко понижаются (от 1,5 до 2,7 раза). Тренд изменения лабильных свойств почвы достаточно устойчив, так как даже через 15–20 лет после вырубki леса сохраняется кислотность растворов почвы и вероятность более интенсивного протекания элювиальных процессов не только органо-генных содержаний, но и ее минеральной основы.

Следовательно, лесные ценозы способствуют обогащению луговых ценозов не только органическим веществом, но и минеральными элементами, и это фиксируется более низкими концентрациями элементов на послелесных участках по сравнению с естественными условиями (до вырубki леса).

Невысокое содержание органики, малая подвижность ее гидролизуемых компонентов на фоне пассивного воздействия окислительно-восстановительного потенциала (ОВП) лугово-степной почвы определяют неблагоприятный питательный режим в луговых ценозах. Травостои, произрастающие на этих почвах, отличаются низкой продуктивностью.

Уровень обеспечения фитоценозов азотом зависит в основном от высвобождения аммиака из состава сложных органических соединений в почве и подстилке и от экологической обстановки. Вследствие этого в почве постоянно восполняются минеральные соединения азота и обеспечивается его необходимый уровень. При этом лесная подстилка насыщена водорастворимыми и обменными соединениями азота значительно лучше луговых ценозов.

Основываясь на показаниях ОВП лугового ценоза, при которых происходит трансформация азотных соединений, можно заключить, что азот и органическое вещество в луговых ценозах переходят в качественно новое состояние; это обуславливает развитие в почвах процессов, не свойственных горно-луговым ценозам: проявление слабого оглеения, что, очевидно, формируется в условиях сезонного переувлажнения. Поэтому окислительно-восстановительная обстановка почв во многих случаях помогает выявлению величин интенсивности почвенных процессов и особенностей функционирования почв в различных экологических условиях.

Определение и сопоставление активности ОВП с содержанием различных форм азотных соединений в подстилках и почвах в луговых и лесных ценозах дает основание полагать, что в зависимости от различий биогеохимической и гидрологической обстановок изменяется и миграция элементов, однако при этом сохраняются межэкосистемные связи.

Таблица 2. Содержание и динамика легкогидролизуемого азота в почвах различных ценозов лугостепного пояса, мг/кг (среднее за 2005-2008гг.)

Объект	Генетический горизонт, глубина, см	Май	Июль	Сентябрь
Лесной ценоз (смешанный лес)				
подстилка	Ао - 0 - 5	352,6	276,8	64,5
почва	А ₁ 5 - 10	85,0	98,5	51,5
Луговой ценоз, сенокос (послелесной участок)				
подстилка	Ао - 0 - 2	157,0	94,3	43,4
почва	А ₁ 5 - 10	52,6	39,7	26,2
Луговой ценоз, сенокос				
подстилка	Ао - 0 - 2	78,2	52,5	18,4
почва	А ₁ 5 - 10	26,7	19,4	12,2

Для экосистемы лугостепного пояса характерна специфическая динамика содержания азота, которая четко проявляется при антропогенном воздействии. Одним из антропогенных факторов трансформации среды являлась вырубка леса, в результате которой имели место значительные изменения в состоянии уже послелесных почв. У последних еще сохраняется кислая реакция почв, что обуславливает усиление элювиальных процессов, и как следствие - увеличение выноса легкогидролизуемого азота вниз по профилю почвы (табл. 2). При этом интенсивное прогревание почвы при отсутствии затеняющего эффекта древесного полога обуславливает более интенсивное продуцирование азотных соединений, чем до вырубки.

В распределении легкогидролизуемого азота по профилю почвы заметно выделяется самый поверхностный слой мощностью 0-10 см, в котором происходят в основном все элювиально-аккумулятивные процессы. Чаще всего максимум в его содержании приурочен к весеннему сезону года. Четырехлетние наблюдения (2005-2008 гг.) за динамикой легкогидролизуемого азота показали, что количество его непостоянно как по годам, так и по сезонам года. Количество его в подстилке лесного ценоза в течение весенне-осеннего сезона варьировало в пределах 64,5-352,6 мг/кг, а в почве - 51,5-85,0 мг/кг, но уже к концу сентября оба показателя снизились, что свидетельствует не только об его интенсивной минерализации, но и о пассивном накоплении. Низкое содержание его отмечалось как в начале вегетации, так и в конце, т.е. недостаток энергетического материала для процессов аммонификации в подстилках особенно характерен для лугового ценоза. Такая динамика связана с неодинаковой интенсивностью минерализации азотсодержащей органики, поскольку разложение легкогидролизуемого азота в подстилке лугового ценоза происходит быстрее. В начале осени содержание легкогидролизуемого азота в подстилках снизилось до 18,4 мг/кг, что свидетельствует не только об его интенсивной минерализации, но и активном выщелачивании за счет интенсивных дождевых осадков.

Особо следует отметить, что на послелесном участке под вырубкой по сравнению с луговым ценозом отмечаются высокие показатели гидролизуемого азота как в подстилке, так и в почве. Это подтверждает тот факт, что послелесной луговой участок наследует показатели лесного ценоза. Это связано с тем, что минерализация органических соединений в почве под луговым ценозом происходит более быстрыми темпами; кроме того, почва под лугом прогревается лучше и быстрее, что также способствует более полной реализации потенциальных запасов энергетического материала.

Рассмотрев вопросы миграции биогенных элементов в луговых и лесных ценозах одного географического пояса, можно отметить большую роль подстилки в процессах превращения азотсодержащей органики. При этом переход от лесного ценоза к молодому лугу сопровождается большими изменениями в содержании азота и органического углерода, и по мере формирования луговых ценозов их содержание в почвах понижаются.

Следовательно, специфика трансформации и дальнейшего развития послелесных почв обусловлена особенностями лесного ценоза и миграционных процессов, свойственных лугостепному поясу горной экосистемы. В лесных почвах имело место развитие элювиальных процессов, связанных с увеличением актуальной кислотности и обуславливающих более высокую мобилизацию азотсодержащего органического вещества и минеральных элементов в процессе поддержания межэкосистемных связей с луговым ценозом.

В межэкосистемных связях другим важным аспектом являются водные потоки, включающие в себя различные генетические категории ландшафтных вод:

атмосферные осадки – внутрипочвенный сток (лизиметрические воды) – водотоки – речной сток. Этот блок экосистемы обеспечивает внутрисистемные связи между компонентами экосистемы, вынос веществ из нее и формирование элементного состава результирующих речных вод, чем и обуславливает реализацию ландшафтно-геохимических процессов в условиях гумидного климата.

Сопоставление химического состава лизиметрических растворов в нижних почвенных горизонтах и водотоков в горных экосистемах рассматриваемого высотного ряда позволяет в определенной степени рассмотреть дальнейшие процессы трансформации сквозного потока веществ и формирования речных вод. Как показали наши исследования, основные закономерности формирования вод местного стока характерны для горных экосистем по всему высотному диапазону (3270-1127м абсолютной высоты).

Воды и водотоки в высокогорных экосистемах, характеризующие начальный этап формирования речных вод в самих истоках – это слабокислые, очень мало минерализованные воды, преимущественно гидрокарбонатно-кальциевого состава, которые практически полностью преемствуют уровень кислотности и степень ионной и общей минерализации лизиметрических вод из нижних почвенных горизонтов (Табл.3).

Таблица 3. Химический состав атмосферных осадков, лизиметрических вод, водотоков и речной воды бассейна р. Амберд Арагацского массива, мг/л (среднее за 2005-2008гг.)

Объект, абсолют. высота		pH	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺	K ⁺	NH ₄ ⁺	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	PO ₄ ³⁻	Сумма ионов
Атмосф.осадки, 3270 м		6,05	4,00	3,80	0,20	0,54	0,82	0,03	1,59	10,3	12,2	4,94	0,22	38,4
Лизиметрические воды (глубина 0-50см)	Альпийский пояс (3270м)	5,90	8,03	1,2	0,20	1,1	0,30	0,21	1,8	5,3	14,6	7,2	0,07	45,9
	Лугостепной пояс (2085м)	7,40	10,02	3,40	0,40	2,60	1,40	0,20	3,00	12,8	22,0	9,6	0,20	73,0
Водотоки (3000м)		6,75	3,21	2,12	1,05	1,44	0,30	0,03	1,36	3,3	13,4	4,8	0,44	39,2
Река Амберд (1127м)		7,01	7,82	5,00	3,90	2,72	0,35	0,04	1,68	13,1	27,3	9,6	0,33	78,9

Речной сток в пределах рассматриваемого высотного ряда достаточно четко отражает специфику формирования речных вод по мере перехода от ландшафтно-геохимических условий высокогорных экосистем к условиям среднегорных: постепенная нейтрализация слабокислых в высокогорных истоках речных вод и увеличение pH до нейтральных; соответственно, увеличение гидрокарбонатной составляющей по сравнению с сульфатной; возрастание ионной и общей минерализации. По соотношению анионов речные воды имеют стабильный гидрокарбонатно-сульфатный в истоках и гидрокарбонатно-хлористый – в среднегорных высотных позициях состав. По мере снижения абсолютных высот речной сток Арагацского массива приобретает по соотношению катионов стабильный кальций-магниевый состав, начи-

ная от истоков. В целом же воды р. Амберд, как и водотоки, практически полностью преобладают степень ионной и общей минерализации лизиметрических вод, сформировавшихся в почвенном профиле, а также преимущественно и тип соотношения ионов основного солевого состава.

Таким образом, комплексные ландшафтно-геохимические исследования горных экосистем Арагацского массива, где представлены основные типы экосистем высотной поясности субрегиона (диапазон высот 1127-3270 м), показали, что взаимодействие между различными системами играет роль важнейшего механизма, который обеспечивает как целостность экосистемы, так и связанность отдельных ее компонентов миграционными потоками веществ, диагностирующие важнейшие межэкосистемные связи в системах “атмосферные осадки – внутрипочвенный сток – речные воды” и “лесной – послелесной – луговой ценозы”.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аристовская Т.В. Микробиология процессов почвообразования. Л., 187с., 1980.
2. Елпатьевский П.В. Геохимия миграционных потоков в природных и природно-техногенных геосистемах. М., “Наука”, 253с., 1993.
3. Кауричев И.С., Орлов Д.С. Окислительно-восстановительные процессы и их роль в генезисе и плодородии почв. М., Колос, 247с., 1982.
4. Ковда В.А. Биосфера, почвы и их использование. М., 128с., 1974.
5. Кудеяров В.Н. Об интенсификации вовлечения азота в его биогеохимический цикл. В кн.: Круговорот и баланс азота в системе почва-удобрение-растение-вода, М., Наука, с.280-284, 1979.
6. Милановский Е.Ю., Шейн Е.В., Степанов А.А. Ландшафтно-биохимические свойства органического вещества и структура почвы, Почвоведение, 6, с.122-126. 1993.
7. Орлов Д.С. Гумусовые кислоты почв. М., “Наука”.
8. Реваян Р.Г. Биогеохимическая цикличность химических элементов и проблемы устойчивости экосистем. Доклады НАН Армении, 98, 4, с.357-362, 1998.
9. MacCarthy P. The principles of humic substances. Soil Science. 166, 11. p. 738-751, 2001.

Поступила 28.06.2010



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 4(62), 2010

ՀԱՏԱՊՏՂԱՅԻՆ ԿԵՆՈՒ ՍԵՐՄԵՐԻ ՖԻԶԻԿԱՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱԿԱՆ ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՏԱՐԲԵՐ ԱՆՏԱՌԱՅԻՆ ՇՐՋԱՆՆԵՐՈՒՄ

Վ.Լ. ԲԱԴՅԱՆ

ՀՀ ԲՆ, Արգելոցապարկային համալիրի ՊՈԱԿ, Կոտայքի մարզ գ.Ջրվեժ
badalyan_vahan@yahoo.com

Կատարված ուսումնասիրությունների արդյունքները փաստում են, որ բնակլիմայական տարբեր պայմաններում աճող հատապտղային կենու (*Taxus baccata* L.) սերմերի ֆիզիկատեխնոլոգիական հատկությունների միջև էական տարբերություններ չկան. դա հնարավորություն է ընձեռում ցանքի բոլոր դեպքերի համար մշակել մեկ ցանիչ ապարատ:

*Կենի հատապտղային և սերմ և ֆիզիկատեխնոլոգիական
հատկություններ և ռելիկտ*

Исследования показывают, что семена тиса ягодного (*Taxus baccata* L.), произрастающего в разных климатических условиях, особо не различаются своими физико-технологическими свойствами, что дает возможность разработать один высеивающий аппарат для всех случаев посева.

Тис ягодный и семя и физико-технологические свойства и реликт

Results of investigations showed that the seeds of common yew (*Taxus baccata* L.) growing in different climatic conditions did not revealed differences between technological and physiological properties. This gives us possibility to develop one sowing apparatus for all cases.

*Common yew and seed and physiological and technological specifications and
relict*

Հայաստանն իր աշխարհագրական դիրքով, ռելիեֆի առանձնահատկություններով, լանդշաֆտի ուղղաձիգ գոտիականությամբ յուրահատուկ լեռնային երկիր է, որոնցով էլ պայմանավորված է ուրույն բնակլիմայական պայմանների և հարուստ կենսաբազմազանության առկայությունը: Երկրի բուսականության ռեսուրսները ներառում են 3500 տեսակ բարձրակարգ բույսեր. 323-ը ծառաբույսեր են [2], որոնց թվում կան այնպիսիք, որոնք, նախկինում զբաղեցնելով անհամեմատ ընդարձակ տարածքներ, կլիմայական և մարդածին գործոնների ազդեցության հետևանքով ներկայումս պահպանվել են փոքր ծառուտների կամ մենաձառերի տեսքով: Դրանց թվին է պատկանում հատապտղային կենին (*Taxus baccata* L.), որը Հայաստանում աճում է Դիլիջանի, Իջևանի, Նոյեմբերյանի, Բերդի, Ալավերդու և Կապանի տարածաշրջաններում [3]: Ըստ մեր դիտարկումների հանրապետության գրեթե բոլոր տարածքներում առկա է բնական վերականգնման շատ ցածր ցուցանիշ:

Կենին 10-25 (30)մ բարձրության մինչև 150 (250)սմ բնի տրամագծով երկտուն, հազվադեպ միատուն ծառ է (նկ.1): Անտառում սերմնատվությունը սկսում է 70-120, իսկ առատ լուսային պայմաններում՝ 20-30 տարեկանից: Կոնսառաջացումը տեղի է ունենում ապրիլ-մայիս ամիսներին: Փոշոտումը տեղի է ունենում քամու միջոցով: Սերմերը հատունանում են նույն տարին՝ օգոստոս-սեպտեմբեր ամիսներին: Նրանք ձվաձև են,

սրածայր: Հյութալի սերմնամաշկը վառ կարմիր է, գավաթանման և ընդգրկում է սերմը մինչև գագաթը, սակայն այն չի սերտաճում և սերմը չի պարփակում իր մեջ [2, 3]:

Կենին և նրա բազմաթիվ պարտիզային ձևերը՝ *Nidiformis*, *Summergold*, *Nana*, *Compacta*, *Semperaurea* և այլն, շնորհիվ բարձր գեղագարդության, լայն կիրառում են գտել կանաչապատման մեջ, հատկապես եվրոպական բազմաթիվ երկրներում, որտեղ օդի հարաբերական խոնավությունը բավականին բարձր է:



Նկ. 1. Հատապտղային կենու ասեղնատերևներն ու սերմերը

Հաշվի առնելով Հայաստանի անտառներում հատապտղային կենու ինքնավերականգնման դժվարությունները, ինչպես նաև կանաչապատման մեջ օգտագործելու հեռանկարները, մեր կողմից խնդիր է դրվել ուսումնասիրել կենու սերմերի ֆիզիկատեխնոլոգիական հատկությունները (երկարությունը, փոխադրահայաց տրամագծերը, ծավալային զանգվածը, 1000 սերմի կշիռը, ներքին և արտաքին շփման անկյունները երկաթի, հղկված փայտի, ռետինի հետ), որոնք հետագայում կարող են հիմք հանդիսանալ սերմնացան ապարատի մշակման համար. այն լայն կիրառություն կգտնի անտառվերականգնման աշխատանքներում և տնկարանային տնտեսություններում: Մերմնացան ապարատի նախագծման համար կարևորվում է սերմերի գծային չափերն ու երկրաչափական ձևերը, որոնք վճռական նշանակություն ունեն ցանքի բավարար իրականացման համար: Նշված տեխնոլոգիական հատկություններով բնութագրվում են անցքերից սերմերի արտահոսելու գործընթացը:

Նյութ և մեթոդ: Ուսումնասիրության նյութ են հանդիսացել 2007-2009թթ. ՀՀ անտառներից մթերված կենու սերմերը, որոնց ուսումնասիրությունները կատարվել են լաբորատոր պայմաններում: Յուրաքանչյուր տարածաշրջանից առանձնացվել են հարյուրական սերմ, որոշվել է դրանց երկարությունը (L) և փոխադրահայաց տրամագծերը (D_1 , D_2) (նկ. 2): Բացի գծային չափերից, որոշվել են նաև ծավալային զանգվածը, 1000 սերմի կշիռը, ներքին և արտաքին շփման անկյունները երկաթի, հղկված փայտի և ռետինի հետ:



Նկ. 2. Հատապտղային կենու սերմերի գծային չափերի վերցման սխեման

Բարձր սորունության նյութերի ներքին շփման անկյունը կարելի է որոշել նյութի բնական թեքության անկյամբ, որը որոշվում է նյութը լցնելով հարթ և ողորկ մակերևույթ ունեցող հարթակի վրա այնքան, որ ձևավորվի հստակ անկյուն, ինչը և կլինի նյութի բնական թեքության անկյունը [1]:

Արտաքին շփման անկյունը որոշելու համար օգտվել ենք նմանատիպ գիտափորձերի համար նախատեսված ստենդից, որի հիմնական կառուցվածքային միավորը շարժական հարթակն է: Հարթակի մի ծայրը անշարժ ամրացված է, իսկ մյուսն ունի բարձրացնելու և որոշակի անկյուն կազմելու հնարավորություն: Փորձանմուշը դրվում է հարթակի վրա և բարձրացվում այնքան ժամանակ, մինչև այն սկսի սահել: Փորձերը դրվել են հինգ կրկնությամբ:

Արդյունքներ և քննարկում: Ուսումնասիրության արդյունքներից պարզվել է, որ տարբեր տարածաշրջաններից մթերված սերմերի ֆիզիկա-տեխնոլոգիական հատկությունները բնութագրող ցուցանիշների մեջ էական տարբերություններ չեն նկատվում (աղ. 1): Սերմերի միջին երկարությունը տատանվում է 6.3-6.8 մմ, մեծ տրամագծերի դեպքում՝ 4.7-4.9 մմ, իսկ փոքր տրամագծերի դեպքում՝ 4.3-4.5 մմ սահմաններում:

Աղյուսակ 1. Հատապտղային կենու սերմերի ֆիզիկա-տեխնոլոգիական հատկությունները

Ֆիզիկա-տեխնոլոգիական հատկությունները	Տարածաշրջան					
	Ալավերդի	Ալգեձոր	Դիլիջան	Իջլան	Կապան	Նոյեմբերյան
Գծային չափերը, մմ						
L	6.5	6.8	6.6	6.3	6.6	6.4
D ₁	4.8	4.7	4.9	4.9	4.8	4.8
D ₂	4.3	4.3	4.5	4.3	4.4	4.4
Ծավալային զանգվածը, գ/լիտր	556.0	563.7	558.2	568.4	560.2	565.4
1000 հատի բացարձակ զանգվածը, գ	68.0	74.9	74.8	67.8	70.1	67.6

Ֆիզիկական ցուցանիշների ուսումնասիրություններից բացի ուսումնասիրվել են նաև որոշ տեխնոլոգիական ցուցանիշներ՝ ներքին շփման անկյունը՝ α ($\approx 19^\circ$), ինչպես նաև որոշ նյութերի հետ արտաքին շփման անկյունը. երկաթ - 26° , հղկած փայտ - 31° , ռետին - 42° :

Ներքին և արտաքին շփման անկյունների արդյունքները նույնն են եղել բոլոր տարածաշրջաններից մթերված սերմերի համար:

Բնակլիմայական տարբեր պայմաններում աճող հատապտղային կենու սերմերի ֆիզիկա-տեխնոլոգիական հատկությունների միջև արձանագրված ոչ մեծ տարբերությունները հնարավորություն են ընձեռում ցանքի բոլոր դեպքերի համար մշակել մեկ ցանիչ ապարատ:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. *Գրիգորյան Շ.Մ.* Մաթեմատիկական վիճակագրության տարրերը և գիտափորձի պլանավորման տեսությունը: Երևան, Աստղիկ, 2001:
2. *Վարդանյան Օ.Հ.* Ծառագիտություն: Երևան, Հայկական գյուղատնտեսական ակադեմիա, 2005:
3. *Վարդանյան Օ.Հ., Բադալյան Վ.Լ., Հովսեփյան Ռ.Ա.* Հատապտղային կենին Դեբեդ գետի ավազանում: Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 62, 1, էջ 93-98, 2010:

Ստացվել է 05.06.2010



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 4(62), 2010

ՏԱՐԲԵՐ ԳԵՆՈՏԻՊԻ ԵՎ ՍԵՐՈՒՆՂՆԵՐԻ ԱՅԾԵՐԻ ԱՐՅԱՆ ՍԵՇՈՆԱՅԻՆ ՈՐՈՇ ԿԵՆՍԱԲԻՄԻԱԿԱՆ ՓՈՓՈԽՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

Գ.ՅՈՒ. ՄԱՐՄԱՐՅԱՆ, Վ.Կ. ԳԱՍՊԱՐՅԱՆ, Ա.Լ. ՄՈՎՍԻՍՅԱՆ,
Ա.Մ. ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ, Ռ.Գ. ԶԱՄԱԼՅԱՆ

Հայաստանի պետական ագրարային համալսարան

Հետազոտվել են ազոտային նյութափոխանակության ցուցանիշները
այծերի տարբեր սերունդների և տեղական և թոգենբուրգյան ցեղերի, ինչպես
ևս ևս ևս խառնածինների մոտ: Որոշվել են լակտատդեհիդրոգենազի (ԼԴԳ) և
ալանինտրանսամինազի (ԱՏԱ) ակտիվության սեզոնային տատանումները:
Տարիքի հետ ցեղերի միջև հայտնաբերվել է ֆերմենտային ակտիվության հա-
վասարեցում: Խաչասերումը նպաստում է ազոտային նյութափոխանակության
ակտիվացմանը և գլուտամինի մակարդակի բարձացմանը, որոնք ապահովում
են իմունային բջիջները նյութերով և էներգիայով:

*Այծ - սեզոն - արյուն - ֆերմենտ - գլուտամին - կրեատինին -
միզանյութ - ամոնիակ*

Изучены показатели азотистого обмена разных поколений и пород коз –
местных и тогенбургских, а также их помесей. Выявлены сезонные колебания
активности ферментов крови, в частности ЛДГ и АЛТ. Констатировано
выравнивание породных различий ферментной активности крови с возрастом.
Скращивание способствует активизации азотистого обмена и повышению
уровня глутамина, обеспечивающего иммунные клетки веществом и энергией.

Козы – сезон – кровь – фермент – глутамин – креатинин – мочевины – аммиак

The indices of nitrogen metabolism in blood of different breeds of goats and their
crossbreeds have been studied. Seasonal fluctuations regarding the activity of blood
enzymes have been found out, namely LDG and ALT. It has been noted that the breed
differences in enzyme activity of blood equalize with age. Crossing makes process of
nitrogen metabolism more active and causes the glutamine level to increase which pro-
vides the immune cells with substance and energy.

*Goat – season – blood – enzyme – glutamine – creatinine – urea –
ammonium*

Հայաստանի անասնաբուծության կարևոր բնագավառներից է այծաբուծու-
թյունը, որը ապահովում է բարձրորակ գյուղատնտեսական մթերքների, մասնավոր-
ապես կաթնամթերքների արտադրանքը: Ցավոք, տեղական այծերը օժտված չեն
բարձր կաթնային մթերատվությամբ: Այդ նպատակով 2000թ. Հայաստան են ներ-
մուծվել բարձր կաթնատվություն ունեցող այծերի ցեղեր, որոնք տրամախաչվել են
տեղական ցեղի հետ: Սելեկցիայի միջոցով հաջողվել է զգալիորեն բարձրացնել տե-
ղական այծերի կաթնատվությունը: Հայտնի է, որ մթերատվության հիմքում ընկած
են օրգանիզմում ընթացող նյութափոխանակության՝ հատկապես ազոտական գոր-
ծընթացները, որոնց ուսումնասիրության արդյունքները և ներկայացված են տվյալ
աշխատանքում:

Ուսումնասիրվել են տեղական և ներկրված (թոգենբուրգ) ցեղերի այծերի և նրանց խառնածինների տարբեր սերունդների արյան ազոտային և էներգետիկ նյութափոխանակության ցուցանիշները, որոնք կարող են կապ ունենալ այծերի մթերատվության և առողջության հետ: Այծերը բուծվում են Եղեգնաձորի, Արիդե այծաբուծական կենտրոնում:

Նյութ և մեթոդ: Արյունը վերցվել է ներմուծված Թոգենբուրգյան, տեղական և համապատասխան հասակի տրամախաչված տարբեր սերնդի այծերից (F_1 , F_2 , F_3): Յուրաքանչյուր խմբում առանձնացվել են 5 կենդանիներ, որոնցից վերցվել է 10 մլ արյուն, տեղադրվել 1 ժամով թերմոստատ 37°C -ի պայմաններում 3.5 %-անոց կիտրոնաթթվի և ԵՂՏԱ-ի առկայությամբ: Ցենտրիֆուգացումից հետո ստացված արյան շիճուկը օգտագործվել է կենսաքիմիական հետազոտությունների համար: Որոշվել են ազոտական նյութափոխանակության որոշ մասնակիցների և արգասիքների (գլուտամին, ամոնիակ, միզանյութ, կրեատինին) քանակները և ֆերմենտների (ԼԴՀ-լակտատդեհիդրոգենազ, ԱՏՏ-ալանինամինառանսֆերազ, ԱՍՏ-ասպարտատ-ամինատրանսֆերազ, ԱԴԱ-ադենոզինդեզամինազ) ակտիվությունը:

Ամոնիակը և գլուտամինը որոշվել են միկրոդիֆուզիոն մեթոդի միջոցով [2, 9]: Միզանյութը որոշվել է ուրեազային եղանակով [10], կրեատինինը՝ պիկրինաթթվի հետ առաացող գունավոր կոմպլեքսի 500-520 նմ երկարությամբ ալիքի տակ գրանցման միջոցով [5]:

ԱԴԱ-ի ակտիվությունը որոշվել է ըստ ադենոզինի դեզամինացման ընթացքում առաջացած ամոնիակի, որը ստացվել է միկրոդիֆուզիոն եղանակով [2, 9]:

ԱՏՏ-ի և ԱՏՏ-ի ակտիվությունը որոշվել է սպեկտրոֆոտոմետրիկ եղանակով ֆերմենտի ռեակցիայի ընթացքում ՆԱԴՀ-ի 340 նմ ալիքի երկարության տակ կլանման նվազմամբ [3]:

Նման սպեկտրոֆոտոմետրիկ եղանակով որոշվել է ԼԴՀ-ի ակտիվությունը [4, 11]:

Ստացված արդյունքները ելթարկվել են վիճակագրական մշակման համաձայն Ստյուդենտի չափանիշի:

Արդյունքներ և քննարկում: Աղ. 1-ում ներկայացված տվյալները ցույց են տալիս, որ ԼԴՀ և ԱՏՏ ակտիվությունը բարձր է ամռանը և աշնանը, իսկ ԱԴԱ ակտիվությունը հակառակը՝ բարձր է գարնանը: Ասպարտատրանսամինազի ակտիվությունը սեզոնային տարբերություն չի դրսևորում:

Աղյուսակ 1. Արյան ֆերմենտների ակտիվությունը

Ֆերմենտներ, միավոր/մլ	Այծերի ցեղերը	Փորձարկման սեզոն		
		գարուն (2-ամսեկան)	ամառ (3-ամսեկան)	աշուն (7-ամսեկան)
ԼԴՀ	F1	95,6±8,4	195,6± 21,5	245,8± 23,2
	F2	112,5±9,5	538,0±57,0	225,5±22,5
	F3	87,4±9,1	247,0±70,7	262,4± 28,4
	Տեղական	117,7± 12,8	289,0± 23,4	295,8± 31,6
	Թոգենբուրգյան	105,4± 14,2	215,0±22,4	264,8±34,5
ԱՏՏ	F1	20,7± 1,4	36,5±3,8	30,6±3,3
	F2	18,3± 1,2	57,8± 3,35	39,2± 4,3
	F3	15,7± 1,8	58,2± 0,75	31,4± 2,9
	Տեղական	19,8±2,3	28,7± 3,2	29,4±3,7
	Թոգենբուրգյան	18,5± 1,5	30,8± 4,5	27,4± 2,2
ԱՍՏ	F1	21,5±2,2	17,5± 1,8	12,2±0,9
	F2	18,4±2,2	63,4± 3,9	18,7± 2,1
	F3	17,5± 1,9	67,7± 3,0	22,4±2,3
	Տեղական	27,3±3,5	19,5± 1,3	18,9± 2,3
	Թոգենբուրգյան	19,5± 1,8	16,3± 1,5	16,5± 0,9
ԱԴԱ	F1	7,5±0,6	6,7± 1,0	7,4± 1,2
	F2	8,9± 1,2	7,54± 0,46	6,0±0,5
	F3	8,5± 1,1	6,58± 1,1	5,8± 0,7
	Տեղական	8,8± 1,0	7,3± 0,5	7,0± 0,7
	Թոգենբուրգյան	7,8± 1,0	6,4± 0,7	6,9± 0,5

Աղյուսակ 2. Այծերի արյան պլազմայի որոշ կենսաքիմիական ցուցանիշները

Այծերի ցեղերը, (2 ամս.)	Միզանյութ, մմոլ	Կրեատինին, մկմոլ	Ամոնիակ մմոլ	Գլուտամին, մմոլ
F1	2.5 (0.2)	118 (9)	0,06(0,002)	0.63 (0.10)
F2	2.9 (0.5)	107 (6)	0,07(0,005)	0.58 (0.03)
F3	3.7 (0.2)	91 (9)	0,07(0.004)	0.72 (0.08)
Տեղական	3.6 (0.2)	98 (6)	0.10(0,005)	0.42 (0.05)
Տոգենբուրգյան	3.8 (0.3)	132 (6)	0,05(0,001)	0.62 (0.05)

Պետք է նշել, որ տրամախաչումը հասակի հետ բերում է ֆերմենտների ակտիվության համեմատաբար հավասարմանը: Սակայն տեղական այծերի արյան պլազմայի LԴՀ-ի ակտիվությունը ավելի բարձր է, քան թոգենբուրգյան կամ խառնածին այծերի մոտ, ինչը չի նկատվում մնացած ուսումնասիրված ֆերմենտների նկատմամբ:

Աղ. 2-ում ներկայացված տվյալները ցույց են տալիս, որ ցեղային տարբերությունները, որոնք դիտվում էին տեղական այծերի ցեղերի միջև [1], հասակի հետ միասին նվազեցվում են, հավանաբար, հարմարվողական մեխանիզմների մոբիլիզացման հետևանքով: Այսպես, խառնածինների արյան պլազմայի միզանյութի քանակը հասակի հետ աճում է, իսկ կրեատինինի քանակը նվազում, մոտենալով տեղական այծերի ցուցանիշներին: Հավանական է, որ դա կապված է սպիտակուցային նյութափոխանակության ինտենսիվացման և պաշարային էներգիայի ֆոսֆոկրեատինի տեսքով կուտակման հետ: Միևնույն ժամանակ գլյուտամինի քանակը, որը մեծ դեր է խաղում իմունային համակարգի բջիջների գործունեությանը [6,7,8], խառնածինների և թոգեն-բուրգյան ցեղի այծերի մոտ ավելի բարձր է, քան տեղական այծերի արյան պլազմայում:

Այսպիսով կարելի է ասել, որ տրամախաչումը նպաստում է ազոտային նյութափոխանակության գործընթացների խթանմանը և իմունային համակարգի բջիջներին էներգիայի և նյութի աղբյուրով ապահովմանը:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. *Мармрян Г.Ю., Камалян Р.Г.* Некоторые показатели азотистого обмена и иммунитета в сыворотке крови разводимых в Армении коз., Ереван, с.224-226, 2001.
2. *Силакова А.И., Труш Г.П., Являкова А.* Микрометод определения аммиака и глютамина в тканевых трихлоруксусных экстрактах. Вопросы мед. химии, 5 с., 538-542, 1962.
3. *Bergmeyer HU, Scheide P, Wahlfeld;* Optimization of methods for AST and alt; Clin Chem. 24, 1, 58-73, 1978.
4. *Henry J.* Clinical diagnosis management by laboratory methods, 435 p., 1974.
5. *Herta H.* A procedure increasing the spesifyty of the Jaffe reaction for the determination of creatine and in urine and plasma. Clin Clim Acta, 1, 210-224, 1956.
6. *Newsholme E.A.* Nutration of immune cells:The implifications for whole body metabolism. Braz.J.Med.Biol.Res. 30, p.345-361, 1997.
7. *Newsholme P.* Why Is L-Glutamine Metabolism Inportant to Cells of the Immune System in Health.Postinjury, Surgery or Infection? J.Nutrition, 131, 2515S-2522S, 2001,
8. *Newsholme P., Lima M.M.R., J.Procopio, T.C.Pithon-Curi,S.Q.Doi,R.B.Bazotte and R.Curi.* Glutamine and glutamate as vital metabolites. Braz J.Med.Biol.Res. 153-163, 2003.
9. *Seligson D., Seligson H.* Micrdiffusion method for determination of nitrogen liberated as ammonia. J. Lab. Clin. Med., 38, p. 324-330, 1951.
10. *Tabacco A., Meiatini F., Moda E., Tazli P.* Simplified enzymic/colorimetric serum urea nitrogen determination. Clin Chem. 25, 2, 336-337, 1979.
11. *Wroblewsky F., La Due J.S.* Lactic Dehydrogenase activity in blood, Proc Soc. Exptl. Biol. Med. 90, p. 210-213, 1955.

Ստացվել է 16.04.2010



ՌԱՖԻԿ ԱՇՈՏԻ ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ

(ծննդյան 80-ամյակի առթիվ)



ատենախոսություն:

Ռ.Ա. Հարությունյանը ծավալուն գիտական աշխատանք է կատարել կենդանիների ջերմակարգավորման ֆիզիոլոգիայի բնագավառում: Նրա գիտական աշխատությունները, որոնք մեծ ճանաչման են արժանացել մասնագետների կողմից, նվիրված են գյուղատնտեսական թռչունների (հավերի) մթերատվության և օրգանիզմի ջերմակարգավորման ու արյան շնչական ֆունկցիաների վրա միջավայրի ջերմության ազդեցության մեխանիզմների ուսումնասիրությանը, ինչպես նաև գյուղատնտեսական կենդանիների ջերմակարգավորման հորմոնային, միջնորդայնության և պեպտիդային մեխանիզմների բացահայտմանը և այդ մեխանիզմներում սիմպատիկ նյարդային համակարգի տարբեր բաժինների նորադրեներգիկ ընկալիչների դերի ուսումնասիրությանը:

Այս աշխատանքների գիտական և գիտապրակտիկ կարևոր նշանակություն ունեցող արդյունքներն ամփոփվել են Ռ.Ա. Հարությունյանի 70-ից ավելի գիտական աշխատանքներում, հանրապետական և միջազգային հանդեսներում, զեկուցվել ու հրատարակվել համագումարների, սիմպոզիումների, գիտաժողովների ժողովածուներում և ամփոփվել նրա ղեկավարական ատենախոսության մեջ:

Դոկտորական ատենախոսության պաշտպանությունից հետո Հարունակվել են Ռ.Ա. Հարությունյանի գիտական հետազոտությունները, նվիրված ջերմակարգավորման նյարդաքիմիական մեխանիզմների ուսումնասիրությանը: Նա ուսումնասիրել է հիստամինի, նյարդապեպտիդ ,Քե(ի, լյցին-էնկեֆալինի, օքսիթոցինի, սոմատոստատինի, թիմոպետինի, անգիոտեն-զինի ազդեցությունը օրգանիզմի ջերմային հոմեոստազի կարգավորման ֆիզիկական և քիմիական մեխանիզմների վրա: Միաժամանակ ապացուցվել է, որ ինչպես ,Կորիդեկեն ցեղատեսակի ոչխարների, այնպես էլ հայկական մուֆլոն ցեղատեսակի ոչխարների տրամախաչումից ստացված խառնածինների մոտ մարմնի թաղանթի տարբեր հատվածներ տարբեր չափով են մասնակցում օրգանիզմից ջերմարձակման գործընթացին:

Ռ.Ա. Հարությունյանի բազմաթիվ գիտական հոդվածներ նվիրված են ջերմակարգավորման մեխանիզմների վրա թույների (մեդվի, օձի) և ստրեսային գործոնների ազդեցությանը:

Ռ.Ա. Հարությունյանի գիտական հետազոտությունների և գիտակազմակերպչական աշխատանքների արդյունքներն ամփոփված են նրա 181 գիտական և 23 գիտահանրամատչելի հոդվածներում:

Գիտահետազոտական աշխատանքներին զուգընթաց Ռ.Ա. Հարությունյանը կատարել է մեծածավալ գիտակազմակերպչական աշխատանք: Նա Լ.Ա. Օրբելու անվան ֆիզիոլոգիայի ինստիտուտի գիտական խորհրդի, Մարդու և կենդանիների ֆիզիոլոգիան մասնագիտացված գիտական խորհրդի, Ուղեղի հետազոտության Միջազգային կազմակերպության՝ ԻԲՐՈՆ ասոցիացիայի անդամ է:

Նա եղել է անդամ ԽՍՀՄ Գիտությունների ակադեմիայի ֆիզիոլոգիական բաժանմունքի, Ջերմակարգավորման ֆիզիոլոգիական մեխանիզմները խորհրդի անդամ, իսկ ներկայումս անդամ է Ուրարտուե համալսարանի գիտական խորհրդի, Երևանի պետական համալսարանի Իջևանի մասնաճյուղի գիտական խորհրդի: Ռ.Ա. Հարությունյանը 1997 թվականին Ամերիկայի Կենսագրական ինստիտուտի կողմից ճանաչվել է Տարվա մարդ:

Ռ.Ա. Հարությունյանը մեծ ավանդ ունի հանրապետությունում երիտասարդ մանկավարժների պատրաստման գործում: Շուրջ 17 տարի նա մանկավարժական գործունեություն է ծավալում Երևանի պետական համալսարանի Իջևանի մասնաճյուղում: Իրեն բնորոշ համեստությամբ և գործին նվիրվածությամբ նա դարձել է մասնաճյուղի ուսանողության և կոլեկտիվի հարգարժան ընկերն ու սիրված մարդը:

Կրթության և գիտության ոլորտում ներդրած մեծագույն ավանդի, գիտական կարժական բեղմնավոր գործունեության համար 2004 թվականին Ռ.Ա. Հարությունյանը պարգևատրվել է ՀՀ Կրթության և գիտության նախարարության ոսկե հուշամեդալով:

*ՀՀ ԳԱԱ ակադ. Լ.Ա. Օրբելու
անվան ֆիզիոլոգիայի ինստիտուտ*