

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

2013

ԽՄԲԱԳՐԱԿԱՆ ԿՈԼԵԳԻԱ

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

ԽՄԲԱԳՐԱԿԱՆ ԽՈՐՀՈՒՐԴ

Յու.Թ. Ալեքսանյան, Է.Գ. Աֆրիկյան, Է.Յ. Գաբրիելյան, Մ.Ա. Դավթյան, Ժ.Ի. Հակոբյան,
Վ.Պ. Հակոբյան, Վ.Գ. Ղարապետյան, Ս.Հ. Մովսիսյան, Վ.Ս. Պողոսյան, Գ.Հ. Փանոսյան,
Լ.Լ. Օսիպյան.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Յ.Ս. Գևորգյան (*главный редактор*), Ր.Մ. Арутюнян (*заместитель главного редактора*),
Ա.Ս. Бояджян (*заместитель главного редактора*),
Ա.Գ. Есаян (*ответственный секретарь*), Ջ.Ա. Варданян, Գ.Ա. Գևորգյան,
Տ.Մ. Майрапетян, Լ.Ր. Манвелян, Ա.Ա. Трчунян

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Յ.Ս. Акопян, Ջ.Ի. Акопян, Յ.Տ. Алексанян, Յ.Գ. Африкян,
Յ.Ս. Габриелян, Մ.Ա. Давтян, Կ.Գ. Карагезян, Տ.Օ. Мовсесян,
Լ.Լ. Осипян, Գ.Ա. Паносян, Կ.Տ. Погосян.

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,
L.R. Manvelyan, S.Kh. Mayrapetyan, A.H. Trchounian,
Zh.H. Vardanyan.

THE EDITORIAL COUNCIL

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

ԲՈՎԱՆԴԱԿՈՒԹՅՈՒՆ

• Տեսական հոդված •

Բարխուդարյան Ն.Ն., Ջաքարյան Հ.Հ. Հեմորֆինները որպես նյարդային և իմունային համակարգերի միջև տեղի ունեցող փոխազդեցության և հիպոթալամ-հիպոֆիզար մակերիկամային համակարգի ակտիվության կարգավորիչներ.....	6-13
---	------

•Փորձարարական հոդվածներ•

Ազիզյան Ռ.Ա. Հաջորդական և պինգ-պոնգ մեխանիզմներով ընթացող երկսուբստրատ ֆերմենտային ռեակցիաների կինետիկայի դինամիկան ոչ մրցակցային արգելալիչի ներկայության դեպքում.....	14-18
Գաբրիելյան Բ.Գ., Ռիզեսկիյ Վ.Կ., Զուրեյ Ա.Վ., Բարսեղյան Ն.Է., Վարդանյան Տ.Վ. Տարբեր բնակլիմայական գոտիների ջրամբարներ ներմուծված արծաթափայլ լճածածանի պոպուլյացիայի սեռային կառուցվածքը.....	19-25
Ավթանդիլյան Ն.Վ. Գլխուղեղի և երիկամների ոչ ուրեոթելիկ արգինազի դերի ուսումնասիրումը պոլիամինների կենսասինթեզում <i>in vitro</i> պայմաններում.....	26-32
Նավասարդյան Մ.Ա. Հայաստանի վայրի ածող կորնզանի տեսակների տարածման արեալի, էկոլոգիական պայմանների և կենսաչափական չափորոշիչների ուսումնասիրությունը.....	33-38
Ղազարյան Կ.Ա., Մովսեսյան Հ.Ս., Ղազարյան Ն.Փ., Գրիգորյան Կ.Վ. Ագարակ քաղաքի շուրջ գտնվող հողերի էկոլոգիական գնահատականը.....	39-43
Հովհաննիսյան Շ.Գ., Բարսեղյան Ա.Հ., Հովհաննիսյան Ս.Ս., Մարության Ա.Վ., Գրիգորյան Գ.Գ. «Նարինե» պրոբիոտիկի ցրտազգայուն մերանների ստացումը.....	44-49
Մամյան Ա.Ս. Փամբակ և Տանձուտ գետերի ֆիտոպլանկտոնային համակեցության տեսակային կազմը, նրա քանակական և որակական բնութագիրը (2009-2010թթ).....	50-55
Վարդանյան Ա.Կ., Խաչատրյան Ա.Ն., Մարկոսյան Լ.Մ., Վարդանյան Ն.Ս. Ցինկի խտանյութի տարրավազման պոլայից մեկուսացված ծծումբ օքսիդացնող բակտերիա.....	56-62
Շիրանի Մ. Օգտագործվող փյունիկյան արմավենու թափոնների ազդեցությունը տոմատի պտուղների քանակի և բերքատվության վրա.....	63-67
Բաբախանյան Մ.Ա., Ղալայան Լ.Մ., Հովհաննիսյան Լ.Է. Ռադիոնուկլիդների կուտակումը մեղրախոտի (<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni) բուսահումքում Արարատյան դաշտի պայմաններում.....	68-71
Մկրտչյան Լ.Պ., Մակարյան Ս.Ռ. Արարատյան որդան կարմիրի <i>Porphyrophora hamelii</i> Brandt (Homoptera, Coccinea, Margarodidae) սիմբիոնտները.....	72-76
Մելքոնյան Լ.Հ. <i>Brevibacterium flavum</i> L-ալանինի նոր բարձրակտիվ շտամ-արտադրիչների միջոցով L-ալանինի կենսասինթեզի պարամետրերի օպտիմալացումը.....	77-84
Կարապյան Գ.Հ., Այվազյան Ա.Է., Քալաշյան Մ.Յ., Ստեփանյան Ի.Է., Նեստերովա Օ.Լ. Հայաստանում <i>Bromius obscurus</i> (Linnaeus, 1758) (<i>Coleoptera, Chrysomelidae</i>) կուսածին պոպուլյացիայի հայտնաբերման մասին.....	85-88
Խաչատրյան Տ.Ս. Հիփոֆիզի թիրոիդ հորմոնի և վահանակազեղձի հորմոնների բաղադրության փոփոխման առանձնահատկությունները վեցամսական առնետների արյան մեջ հիփոթիրեոզի ժամանակ.....	89-92
Աղայան Ս.Ա. «Տերերի լայն սպեկտր – վարակվածության բարձր էքստենսիվություն» կապի բացահայտումը Կովկասի երկու նստակյաց տեսակի թռչունների լեյկոցիտոզոն ցեղի մակաբույծների մոտ.....	93-99
Չախլյան Գ.Ս. Խոզի նախարտերիցան ջատած կարդիոպեպտիդի պինդ ֆազային սինթեզը.....	100-104
Սևուռյան Դ., Համբարձումյան Ն., Գրիգորյան Մ. Քրոնիկ բորբոքումը՝ որպես ուռուցքների առաջացման պատճառ և մեթաստազների զարգացման հետազոտության առաջադիմությունը.....	105-109
Միմոնյան Ռ.Կ. Ծաղկատման ազդեցությունը ծխախոտի Սամսուն 36 սորտի կենսարդյունավետության վրա.....	110-115
Հովհաննիսյան Ռ.Լ., Ռուխկյան Մ.Յա. <i>Rhabdochona macrostoma</i> (Nematoda: Rhabdochonidae) նեմատոդի հայտնաբերումը Սեվանի կողակի մոտ.....	116-119

• Համառոտ հաղորդումներ •

Հարությունյան Գ.Ա., Հերթեցյան Ե.Կ., Հարությունյան Ռ.Գ. Նոր տվյալներ Հայաստանի լվիճների մակաբույծ աֆիդիդների (<i>Hymenoptera, Aphidiidae</i>) վերաբերյալ.....	120-122
Չավուշյան Ա.Ս., Հովսեփյան Մ.Ռ., Բոյաջյան Ա.Ս. Աբեռանտ իմունային համակարկիրները և ցիտոկինների արտադրությունը շիզոֆրենիայի ժամանակ.....	123-125
Եղոյան Ա.Կ., Խաչատրյան Ե.Կ., Մաթևոսյան Հ.Հ., Ղազարյան Է.Ա. Խորը շնչառության կամային վերացման Բուտեյկոյի մեթոդի կիրառումը բրոնխիալ ասթմա և թոքերի խրոնիկական օբստրուկտիվ հիվանդություններ ունեցողանձանց վերականգնողական բուժման փուլում.....	126-128
Կարեն Սուրենի Պողոսյան.....	129-130
Նոր բառարան.....	131

СОДЕРЖАНИЕ

• Теоретическая статья •

Бархударян Н.А., Закарян Э.А. Геморфины – регуляторы взаимодействий между нервной и иммунной системами и активности гипоталамо- гипофизарно- надпочечниковой оси.....	6-13
---	------

• Экспериментальные статьи •

Азизян Р.А. Динамика кинетики двусубстратных ферментативных реакций, протекающих последовательно и пинг-понг механизмами в присутствии неконкурентного ингибитора.....	14-18
Габриелян Б.К., Ризевский В.К., Зубей А.В., Барсегян Н.Э., Варданян Т.В. Половая структура популяции карася серебряного, интродуцированного в водоемы различных природно-климатических зон.....	19-25
Автандиян Н.В. Исследование роли неуреотелической аргиназы мозга и почек в биосинтезе полиаминов <i>in vitro</i>	26-32
Навасардян М.А. Исследование экологических условий произрастания биометрических показателей дикорастущего эспарцета (<i>Onobrychis</i> Mill.) в Армении.....	33-38
Казарян К.А., Мовсесян А.С., Казарян Н.П., Григорян К.В. Экологическая оценка почв вокруг города Агарах.....	39-43
Оганесян Г.Г., Барсегян А.А., Оганесян С.С., Марутян А.В., Григорян Г.Г. Получение холодочувствительных заквасок пробиотика “Нарине”.....	44-49
Мамян А.С. Видовой состав, качественная и количественная характеристика фитопланктонного сообщества рек Памбак и Тандзут (2009-2010гг).....	50-55
Варданян А.К., Хачатрян А.Н., Маркосян Л.С., Варданян Н.С. Сероокисляющая бактерия, выделенная из пульпы биовыщелачивания цинкового концентрата.....	56-62
Ширани М. Влияние финиковых пальм как субстрата на урожайность и количество плодов томата.....	63-67
Бабахянян М.А., Калачян Л.М., Оганесян Л.Э. Накопление радионуклидов в медовой траве (<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni) в условиях Араратской равнины.....	68-71
Мкртчян Л.П., Макарян С.Р. Симбионты араратской кошенили <i>Porphyrophora hamelii</i> Brandt (Homoptera, Coccinea, Margarodidae).....	72-76
Мелконян Л.О. Оптимизация параметров биосинтеза L-аланина новыми штаммами-продуцентами <i>Brevibacterium flavum</i>	77-84
Карагян Г.А., Айвазян А.Э., Калашян М.Ю., Степанян И.Э., Нестерова О.Л. Об обнаружении партеогенетической популяции <i>Bromius obscurus</i> (Linnaeus, 1758) (<i>Coleoptera</i> , <i>Chrysomelidae</i>) в Армении.....	85-88
Хачатрян Т.С. Изменение концентрации тиреотропного гормона гипофиза и тиреоидных гормонов в крови у шестимесячных крыс при гипотиреозе.....	89-92
Агаян С.А. Исследование гипотезы связи обилие-распространение инфекции лейкоцитозоон у двух резидентных видов птиц Кавказа.....	93-99
Чаилян Г.С. Твердофазный синтез кардиоактивного пептида, выделенного из предсердий свиньи.....	100-104
Севумян Д., Амбарцумян Н., Григорян М. Роль хронического воспаления при образовании опухоли и прогресс в понимании механизмов метастазирования.....	105-109
Симонян Р.К. Влияние дефлорации на продуктивность табака сорта Самсун 36.....	110-115
Оганесян Р.Л., Рухкян М.Я. Обнаружение <i>Rhabdochona macrostoma</i> (Nematoda: <i>Rhabdochonidae</i>) у севанской храмули.....	116-119

(Краткие сообщения)

Арутюнян Г.А., Эртевян Е.К., Арутюнян Р.Г. Новые данные о паразитах тлей афидиид (<i>Homoptera</i> , <i>Aphididae</i>) Армении.....	120-122
Чавушян А.С., Овсепян М.Р., Бояджян А.С. Аберрантные иммунные комплексы и продукция цитокинов при шизофрении.....	123-125
Егоян А.К., Хачатрян Е.К., Матевосян А.Г., Казарян Э.А. Применение метода волевой ликвидации глубокого дыхания Бутейко при бронхиальной астме и хронических obstructивных заболеваний легких в комплексе реабилитационного лечения.....	126-128
Погосян Карен Суренович.....	129-130
Новый словарь.....	131

CONTENTS

• Theoretical article •

<i>Barkhudaryan N.H., Zakaryan H.H.</i> Hemorphins as activity regulators of interactions between the nervous and the immune systems and the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis	6-13
--	------

• Experimental articles •

<i>Azizyan R.A.</i> Dynamic of kinetic of bi-substrate enzymatic reactions with ping-pong and sequential mechanisms in the presence of non-competitive inhibitor.....	14-18
<i>Gabrielyan B.K., Rizevski V.K., Zubey A.V., Barseghyan N.E., Vardanyan T.V.</i> The sexual structure of crucian carp population, introduced in reservoirs in different natural-climate zones.....	19-25
<i>Avtandilyan N.V.</i> The research of role of non ureotelic arginases in polyamines biosynthesis in brain and kidney <i>in vitro</i>	26-32
<i>Navasardyan M.A.</i> Investigation of the areas of distribution, ecological conditions and biometrical indices of wild growing Sainfoin species of Armenia	33-38
<i>Ghazaryan K.A., Movsesyan H.S., N Ghazaryan P., Grigoryan K.V.</i> The ecological assessment of soils around Agarak town	39-43
<i>Hovhannisyan H.G., Barseghyan A.H., Hovhannisyan S.S., Marutyun A.V., Grigoryan G.G.</i> Obtaining of cold sensitive starters of probiotic “Narine”.....	44-49
<i>Mamyan A.S.</i> The species composition of the Pambak and Tandzut rivers phytoplankton assemblage, their quantitative and qualitative characteristics (2009-2010).....	50-55
<i>Vardanyan A.K., Khachatryan A.N., Markosyan L.S., Vardanyan N.S.</i> Sulfur oxidizing bacteria isolated from bioleaching pulp of zinc concentrate.....	56-62
<i>Shirani M.</i> Effect of date-palm wastes as a substrate on tomato yield and number.....	63-67
<i>Babakhanyan M.A., Ghalachyan L.M., Hovhannisyan L.E.</i> The accumulation of radionuclides in stevia (<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni) in conditions of the Ararat valley.....	68-71
<i>Mkrtychyan L.P., Makaryan S.R.</i> Simbionts of Ararat cochineal <i>Porphyrophora hamelii</i> Brandt (Homoptera, Coccinea, Margarodidae)	72-76
<i>Melkonyan L.H.</i> Optimization of L-alanine biosynthesis parameters by <i>Brevibacterium flavum</i> strain-producers.....	77-84
<i>Karagyan G.H., Ayvazyan A.E. Kalashian M.Yu., Stepanyan I.E. Nesterova O.L.</i> The detection of parthenogenetic population of <i>Bromius obscurus</i> (Linnaeus, 1758) (Coleoptera, Chrysomelidae) in Armenia.....	85-88
<i>Khachatryan T.S.</i> Features of changes in concentration of thyroid hormone of pituitary and thyroid hormones in the blood of six-month rats with hypothyroidism	89-92
<i>Aghayan S.A.</i> Testing the abundance–occupancy hypotheses for leucocytozoon infections of two resident birds in the Caucasus.....	93-99
<i>Chailyan G.S.</i> Solid phase synthesis of cardioactive peptide isolated from pigs atria.....	100-104
<i>Sevumyan D., Ambartsumian N., Grigorian M.</i> Role of chronic inflammation in the process of cancerogenesis and the progress in the investigation of the mechanisms of metastatics.....	105-109
<i>Simonyan R.K.</i> Defloration’s influence on the bioproductivity of the tobacco sort Samsun 36.....	110-115
<i>Hovhannisyan R.L., Rukhkyan M.Ja.</i> The finding of <i>Rhabdochona macrostoma</i> (Nematoda: Rhabdochonidae) in khramulya.....	116-119

• Short communications •

<i>Harutyunyan G.A., Hertevtsyan E.K., Harutyunyan R.G.</i> New data about aphidiid – parasites of aphids (Hymenoptera, Aphidiidae) of Armenia.....	120-122
<i>Chavushyan A.S., Hovsepyan M.R., Boyajyan A.S.</i> Aberrant immune complexes and cytokine production in schizophrenia.....	123-125
<i>Eghoyan A.K., Matevosyan H.H., Ghazaryan E.A., Chachatryan E.K.</i> The use of buteyko’s method of deep respiration volumetry elimination in the restorative treatment of patients with bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary diseases.....	126-128
<i>Poghosyan Karen S.</i>	129-130
New Dictionary.....	131



Biol. Journal of Armenia, 1 (65), 2013

REGULATION OF INTERACTIONS BETWEEN THE NERVOUS AND THE IMMUNE SYSTEMS AND THE HYPOTHALAMO-PITUITARY-ADRENOCORTICAL AXIS ACTIVITY BY HEMORPHINS

N.H. BARKHUDARYAN, H.H. ZAKARYAN

H. Buniatian Institute of Biochemistry NAS RA
nbarkh@yahoo.com

Hemorphins, a family of endogenous nonclassical opioid peptides derived from hemoglobin (Hb), exert a wide spectrum of biological activity by affecting different receptors function. Hemorphins play an important role in the regulation of nervous and immune systems and hypothalamo-pituitary-adrenocortical (HPA) axis activity. Molecular mechanisms underlying the actions of hemorphins involve the integration of Ca^{2+} /calmodulin/calcineurin/NFAT signaling pathway with μ -opioid receptors (MOR) function and other metabolic pathways.

Hemorphin – Ca^{2+} /calmodulin(CaM)/calcineurin/NFAT signaling pathway – MOR – HPA axis – endotoxin-induced stress

Հեմորֆինները հեմոգլոբինից (Hb) առաջացած ոչ դասական էնդոգեն օպիոիդ պեպտիդների ընտանիք են, որոնք օժտված են կենսաբանական ակտիվության լայն սպեկտրով, ազդելով տարբեր ռեցեպտորների ֆունկցիայի վրա: Հեմորֆինները կարևոր դեր են կատարում նյարդային, իմունային և հիպոթալամո-հիպոֆիզար-մակերիկամային (HPA) համակարգերի ակտիվության կարգավորման գործում: Հեմորֆինների ազդման մոլեկուլային մեխանիզմները ներառում են Ca^{2+} /կալմոդուլին/կալցինեյրին/NFAT ազդանշանային ուղու ինտեգրացումը μ -օպիոիդ ռեցեպտորների (MOR) ֆունկցիայի և այլ նյութափոխանակային ուղիների հետ:

Հեմորֆին – Ca^{2+} /կալմոդուլին/կալցինեյրին/NFAT ազդանշանային ուղի – MOR – HPA համակարգ – էնդոտոքսին-ինդուցիվ ստրես

Геморфины являются семейством эндогенных неклассических опиоидных пептидов, предшественником которых является гемоглобин (Hb). Они обладают широким спектром биологической активности, воздействуя на функции различных рецепторов. Геморфины играют важную роль в регуляции нервной и иммунной систем, а также гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой (HPA) оси. Молекулярные механизмы действия геморфинов включают интеграцию Ca^{2+} / кальмодулин/кальцинейрин/NFAT сигнального пути с функцией μ - опиоидных рецепторов (MOR) и других метаболических путей.

Геморфин – Ca^{2+} / кальмодулин/кальцинейрин/NFAT сигнальные пути – MOR – HPA ось – эндотоксин-индуцируемый стресс.

It is well known that biologically active peptides are power instrument for subtle regulation of metabolic processes in the organism in physiology and pathophysiology (stress, infection, inflammation) and this is one of the ways providing the homeostasis of the organism.

Hemorphins are nonclassical opioid peptides derived from hemoglobin (Hb) presented in CNS [25, 10-11, 31], peripheral organs [59] and body fluid [for review see Ref. 41]. They appeared to be relatively stable in tissue extracts and blood plasma, suggesting a physiological significance of these peptides [41]. Hemorphins demonstrate a wide spectrum of biological activity by affecting different receptors function (e.g. μ -, δ - and κ -opioid receptors [60], angiotensin (Ang) IV receptor (AT4) [39], bombesin receptor subtype 3 (hBRS-3) [33] and corticotropin-releasing factor (CRF) receptor(s) [5]. It should be noted, that hemorphins among opioid receptors demonstrate a higher affinity to μ -opioid receptors (MOR) with IC50 in the μ M range [60].

All hemorphins, whatever their source, originated from the same region of the β -chain of Hb (residues 31-40 of bovine and residues 32-41 of human Hb), named LVV-hemorphin-7 [41]. It was shown the small, but significant passage of hemorphin-7 across the blood-brain-barrier [41], however α - and β - globin mRNAs were identified in mouse brain, implying the synthesis of globin in the central nervous system CNS [43].

Accumulating evidence was obtained for the involvement of hemorphins in the regulation of nervous and immune systems function. Hemorphins modulate Ca^{2+} /calmodulin (CaM)-dependent enzymes activity, including calcineurin [11, 8, 14] and inhibit enkephalin-degrading enzymes (e.g. neutral endopeptidase (NEP), aminopeptidase N (APN), dipeptidyl peptidase (DPP) DPP IV [41, 21], and angiotensin-converting enzyme activities [34]. All these enzymes were reported to play an important role in the regulation of nervous and immune system functions [23, 27, 50, 56, 29, 57, 37, 42, 49].

Functional interactions have been described between hemorphins on the one hand and β -endorphin, growth hormone, prolactin [41], substance P (SP) [46], neuropeptide Y (NPY), Met-ENK-Arg-Phe [40] and CRF [5] on the other hand. It should be underscored that hemorphins inhibit the acute inflammatory response to SP by binding with MOR [46], share the pressor activity with NPY and Met-ENK-Arg-Phe [40], which results from the activation of sympathetic nervous system. Furthermore, intracerebroventricular (icv) administration of hemorphin-7 was shown to induce significant enhancement of plasma level of GH and PRL [41]. It has been found out that central CRF and opioid pathways are involved in the interaction between LVV-hemorphin-7 and brain serotonergic system [5]. Because CRF integrates brain multi-system responses to stress [18], the latter finding indicates that hemorphins being present in the hypothalamus [11], pituitary gland [25] and adrenal gland [20], may also be implicated in brain multi-system response to stress. In addition, hemorphin-4 and hemorphin-7 have a capacity to release β -endorphin from pituitary tissue [41]. It should be noted that lymphocytes can synthesize and secrete mentioned neuropeptides. Receptors for these peptides have been found on lymphocytes as well [19].

All of mentioned neuropeptides modulate hypothalamo-pituitary-adrenocortical (HPA) axis activity and participate in the interactions between the immune and the nervous systems [24, 17]. It seems very likely that hemorphins may rank to classical opioid peptides and other mentioned neuropeptides, and share their properties to realize the bidirectional communication between the nervous and the immune system and contribute to the regulation of HPA axis activity. This view is supported by the finding that hemorphins modulate the activity of brain and lymphocytes Ca^{2+} /CaM -dependent protein phosphatase 2B (calcineurin) activity by binding to CaM, exhibiting a concentration-dependent biphasic response on enzyme activity [8, 14]. Calcineurin is known as a key enzyme in the signal transduction cascade leading to T cell activation. This enzyme controls gene expression of several cytokines, including IL-2, tumor necrosis factor α (TNF α) and others via dephosphorylation and nuclear translocation of NFATc (nuclear

factor of activated T cell) family members [50]. In the brain calcineurin regulates synaptic plasticity and synaptic development and participates in neurotransmitters (serotonin (5-HT), noradrenaline (NA), dopamine (DA), glutamate), neuropeptides and neurohormones (e.g. adrenocorticotrophic hormone (ACTH) release [27, 56, 23]. Thus, calcineurin may regulate immune-neuro-endocrine interactions and hemorphins, by modulation of calcineurin activity, may also be involved in the regulation of HPA axis activity in physiological and pathophysiological conditions of the organism.

Relationship between the processing of hemorphins and their mechanism of action on the brain and immune system. Earlier we proposed that hemorphins could be formed in the organism during physiological or pathophysiological conditions as a result of limited proteolysis of blood Hb or globin synthesized in nervous tissue [9]. Indeed, brain high molecular weight (HMW) aspartic proteinase was shown to generate LVV-hemorphin-7 from the β -chain of Hb by cleavage of Leu30-Leu31 and Phe40-Phe41 bonds [9]. The same enzyme, presented in erythrocytes membrane, was identified as a cathepsin E [30]. It has been shown that cathepsin D is also a good candidate for generation of stable VV-hemorphin-7 [22]. It is to be noted that brain cathepsin B participates in the generation of hemorphin-7, LVV-hemorphin-5 and hemorphin-5 from LVV-hemorphin-7 in vitro, acting both as dipeptidyl carboxypeptidase and endopeptidase [4]. By using in vivo microdialysis in combination with electrospray mass spectrometry in vivo processing of LVV-hemorphin-7 in rat brain and blood was studied. Several hemorphins were formed, including hemorphins-7, in both brain and blood [47].

Obviously, there is a relationship between the processing of hemorphins and their mechanism of action. The network of molecules introduced in Fig.1 is presented both in brain and in the immune system. It involves hemorphins, which modulate both brain and lymphocytes calcineurin activity by binding to CaM. Hemorphins, via the modulation of Ca^{2+} /CaM/calcineurin signalling pathway can participate in the regulation of different cytokines production, such as IL-2, IL-6, TNF α and etc. genes expression [50]. IL-1 is also involved in that network. Since IL-1 exerts its activities often in synergy with TNF α and IL-6, and, moreover, each of these three cytokines is capable of inducing others, it is proposed that calcineurin, by participation in the production of TNF α and IL-6 [for review see Ref. 24; 3], can indirectly affect IL-1 production as well. In addition, β -endorphin was reported to regulate the production of IL-1 [19]. Because hemorphins have a capacity to induce the release of β -endorphin [41], so that they may indirectly affect the IL-1 production by release of β -endorphin as well.

Cytokines, namely IL-2, IL-1, TNF α and IL-6, in turn, demonstrate bi-directional interactions with proteinases [28, 1], involved both in hemorphins processing and in the metabolism of cytokines [32]. Furthermore, cathepsins D, E, B were shown to play an important role in the regulation of the immune system function by implication in the antigen processing in the class II major histocompatibility complex pathway [16].

Alzheimers disease (AD) and brain ischemia [45, 51] are examples of CNS pathologies, associated with cytokine dysfunction [7], where the signaling network is involved as presented in fig.1. In these pathologies high levels of hemorphins and their precursor (β -globin fragments, containing hemorphin sequence) [45, 51] were observed.

This was correlated with increased activity of cathepsins D, E, B [36, 51] during mentioned diseases. The observed raise in CaM level also was consistent with a tissue region undergoing insult associated with degeneration [51]. Because hemorphins modulate activity of Ca^{2+} /CaM dependent enzymes [11, 8, 14] by binding with CaM (Kd 2-10 nM) [12], latter finding points to the possible involvement of hemorphins in pathophysiology of AD and brain insult. This was confirmed by involvement of calcineurin in pathophysiology of the same diseases [35, 45, 51].

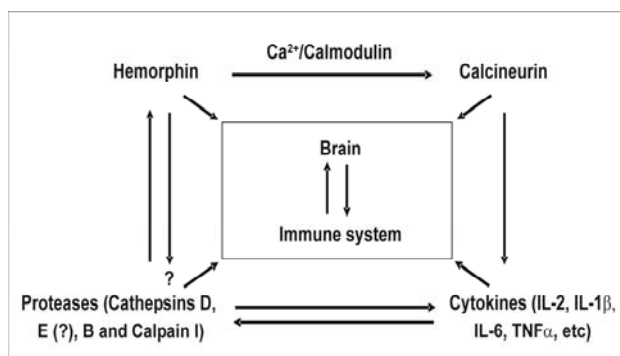


Fig. 1. Potential interactions between the hemorphins processing and their mechanism of action in the brain and immune system [4].

Calpains were reported to be involved in the same CNS pathologies (AD, and brain ischemia) as cathepsins D, E, B [52]. Moreover, it was shown that a calpain-induced cathepsin B release is crucial for the development of the ischemic neuronal death [58]. Because hemorphins regulate μ -calpain activity [6], it is likely that they may indirectly affect cathepsin B activity, being both substrate and regulators of cathepsin B.

Interactions between the messengers within the nervous and the immune system: cytokines, neuropeptides/hormones and neurotransmitters. Accumulated evidence suggests that bidirectional communication existing between the nervous and the immune systems strongly depends on the interactions between the messengers within those systems: cytokines, neuropeptides/hormones and neurotransmitters. Moreover, it has been proposed, that biologically active peptide are important for the manifestation of cytokines functions [7, 17, 24]. It has been reported that one of the mechanisms by which interleukin (IL)-1 stimulates HPA axis on the level of brain is via the stimulation of CRF secretion in the hypothalamus and potential mediators for IL-1 induced CRF secretion are NA and 5-HT [for Review see Ref. 17]. IL-6 and TNF α also activate HPA axis, although they are less potent than IL-1. It has been proposed, that cytokines released from activated immune cells may act as neurotransmitters affecting CNS function [24].

As mentioned above, hemorphins affect the production of Ang II by inhibiting ACE activity [34]; and LVV-H7, which is the most potent in inhibition of ACE activity, is equipotent with Ang IV for AT4 receptor binding [39]. Because pro-inflammatory neuropeptides Ang II [42, 49] and SP [38] are involved in the production of IL-1, TNF α , IL-6, it is suggested that hemorphins by inhibition of Ang II production and SP function may negatively affect the synthesis of these pro-inflammatory cytokines, demonstrating anti-inflammatory properties.

It is necessary to emphasize, that neuropeptides, exert multiple functions in both CNS and periphery either by direct binding with different receptors or by inducing/ inhibiting the release of other neuropeptides and, thus, indirectly affecting those neuropeptides receptors function. The existence of reciprocal synaptic relationships between different peptidergic neurons [26], co-localization of variety of neuropeptides (classical opioid peptides, SP, Ang II, and etc.) and their receptors in certain neurohormone/neurotransmitter (e.g. CRF, oxytocin, vasopressin and etc.) synthesizing neurons [44, 54], and coexistence of neuropeptides and neurotransmitters, as cotransmitters [55], in axon terminals in different brain regions provide evidence for functional interactions of their receptors.

Hemorphins may fulfill their role as a modulators between the immune and the nervous system by hemorphin-neuropeptide (β -endorphin, CRF, SP, NPY, Ang II, Ang IV [41, 5, 46, 34, 40, 39]), hemorphin-cytokine (IL-2, TNF α [8, 13]) and hemorphin-neurotransmitter (5-HT, DA, glutamate [5, 48]) interactions and it is suggested that molecular mechanisms underlying the hemorphin function involve the integrated effects of Ca²⁺/CaM/calcineurin/NFAT signaling pathway with MOR and other receptors function (e.g. CRF receptor(s), [5], NMDA glutamate receptors, serotonin 5-HT_{2A} receptors [48]).

Very recently, it has been shown that LVV-hemorphin-7 and hemorphin-7 act as homeostatic agents in response to endotoxin-induced stress [13]. It is well known that many of the physiological effects associated with LPS are mediated by cytokines, including TNF α , IL-1 and IL-6, the levels of all being elevated as a result of LPS administration [15]. LPS administration activates HPA axis by increasing circulating concentration of adrenocorticotrophic hormone (ACTH), which, in turn, induces downstream release of glucocorticoids from the adrenal cortex [15]. It should be noted, that LPS administration was reported to activate calcineurin as well [53]. It has been shown that LVV-hemorphin-7 and hemorphin-7 are able to regulate HPA axis activity by decreasing in corticosterone and TNF α levels in plasma of rats received ip administration of LPS. Increased activity of calcineurin in both plasma and brain of rats, received ip LPS, was recovered by treatment with hemorphins [13]. Down regulatory effect of hemorphins on increased plasma levels of corticosterone in response to LPS, indicate that hemorphins may have a significant therapeutic potential. It is well established that physiological stress responses are generally considered adaptive. However, under chronic stress most physiological systems are negatively affected by prolonged exposure to glucocorticoids and catecholamines [2]. There is clinical and experimental evidence indicating that stress hormones affect tumor pathogenesis at multiple levels (initiation, tumor growth, and metastasis). Therefore pharmacological interventions targeting immune-neuro-endocrine function at the level of the central nervous system and HPA axis represent a novel strategy for protecting cancer patients.

It is to be underscored that hemorphins have a capacity to modulate the HPA axis activity on the level of brain. The presence of hemorphins in hypothalamus, pituitary gland and adrenal gland, their ability to release β -endorphin from pituitary, and the contribution of central opioid and CRF receptors to stimulatory effect of LVV-hemorphin-7 on serotonergic system support our suggestion. Nevertheless, the presence of MOR on immune cells, peripheral neurons, and detection of hemorphins in adrenal gland cortex and medulla indicate that peripheral impact of hemorphins on HPA axis activity have to be considered.

It is necessary to emphasize that hemorphins, as other members of the endogenous protective system of the organism, come into play mainly in response to pathophysiological conditions (e.g. stress, inflammation, cancer and etc.). In that case hemorphins, like other pleiotropic neuropeptides, serve as one of homeostatic factors that switch on the compensatory systems in the organism. This is based on several mechanisms and by implication of different signaling pathways in order to recover the homeostatic disturbance.

REFERENCES

1. Aisa M.C., Rahman S., Senin U., Maggio D., Russel R.G. Cathepsin B activity in normal human osteoblast-like cells and human osteoblastic osteosarcoma cells (MG-63): regulation by interleukin-1 β and parathyroid hormone. *Biochim, Biophys. Acta*, 1290, 29-36, 1996.
2. Antoni M.H., Lutgendorf SK, Cole SW *et al.* The influence of bio-behavioral factors on tumour biology: pathways and mechanisms. *Nat. Rev. Cancer*, 6, 240-248, 2006.

3. Banzet S., Koulmann N., Simler N., Birot O., Sanchez H., Chapot R., Peinnequin A., Bigard X. Fibre-type specificity of interleukin-6 gene transcription during contraction in rat: association with calcineurin activity. *J. Physiol.*, 566, 839-847, 2005.
4. Barkhudaryan N. Hemorphins: Processing and possible mechanism of action in the brain and immune system. *Proc. Int. Conf. Biochemical and Molecular-Biological Aspects of the Brain Immune System* (A. Galoyan Ed.). Encyclopedia Publishing House, Yerevan, pp.132-139, 2001.
5. Barkhudaryan N. In vivo microdialysis is a tool to study the mechanism of interaction between LVV-hemorphin-7 and brain serotonergic system. *Proc. Int. Conf. "Biotechnology and health" & DAAD Alumni seminar*, Yerevan, pp. 32-42. 2005.
6. Barkhudaryan N., Avakian M., Galoyan A. Ca^{2+} -activated enzymes are target for hypothalamic calmodulin-binding peptide factors. *Abs. 16th ISN/28th ASN Meeting*, (Boston, USA). *J. Neurochem.* 69, Suppl., p. S201A, 1997.
7. Barkhudaryan N., Dunn A.J. Molecular mechanisms of actions of interleukin-6 on the brain, with special reference to serotonin and the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis, *Neurochem. Res.*, 24, 1169-1180, 1999.
8. Barkhudaryan N., Gambarov S., Gyulbayazyan T., Nahapetyan K. LVV-hemorphin-4 modulates Ca^{2+} /calmodulin-dependent pathways in the immune system by the same mechanism as in the brain, *J. Mol. Neurosci.*, 18, 203-210, 2002.
9. Barkhudaryan N., Kellermann J., Galoyan A., Lottspeich F. High molecular weight aspartic endopeptidase generates a coronaro-constrictory peptide from the β -chain of hemoglobin. *FEBS Lett.*, 329, 215-218, 1993.
10. Barkhudaryan N., Kellermann J., Lottspeich F., Galoyan A. Hemoglobin is the precursor of coronaro-constrictory peptide factors. *Neurokhimiya (RAS & NAS RA)*, 10, 146-154, 1991.
11. Barkhudaryan N., Oberthuer W., Lottspeich F., Galoyan A. Structure of hypothalamic coronaro-constrictory peptide factors. *Neurochem. Res.*, 17, 1217-1221, 1992.
12. Barkhudaryan N., Orosz F., Liliom K., Barsegian K., Ovadi J., Galoyan A. New data on binding of hypothalamic coronaro-constrictory peptide factors with calmodulin. *Neurokhimiya (RAS & NAS RA)*, 10, 155-166, 1991.
13. Barkhudaryan N., Zakaryan H., Sarukhanyan F., Gabrielyan A., Dosch D., Kellermann J., Lottspeich F. Hemorphins act as homeostatic agents in response to endotoxin-induced stress. *Neurochem. Res.*, 33, 925-933, 2010.
14. Barsegyan K., Barkhudaryan N., Galoyan A. The investigation of the effect of native and synthetic coronaro-constrictory peptide factors on Ca^{2+} , calmodulin-dependent phosphoprotein phosphatase activity. *Neurokhimiya (RAS & NAS RA)*, 11, 141-149, 1992.
15. Beishuizen A., Thijs L.G. Endotoxin and the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *J. Endotoxin Res.*, 9, 3-24, 2003.
16. Bennett K., Levine T. Ellis J.S., Peanasky R.J., Samloff I.M., Kay J., Chain B.M. Antigen processing for presentation by class II major histocompatibility complex requires cleavage by cathepsin E. *Eur. J. Immunol.*, 22, 1519-1524, 1992.
17. Besedovsky H.O., del Rey A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypothesis. *Endocrine Rev.*, 17, 64-102, 1996.
18. Carrasco G.A., Van de Kar L.D. Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur. J. Pharmacol.*, 463, 235-272, 2003.
19. Carr D. J. J., Blalock J.E. Neuropeptide hormones and receptors common to the immune and neuroendocrine system: bidirectional pathway of intersystem communication. In: Ader R., Felten D.L., Cohen N., eds. *Psychoneuroimmunology*, 2nd ed. San Diego: Academic Press; pp. 573-588, 1991.
20. Cerpa-Poljak A., Lahnstein J., Mason K.E., Smythe G.A., Duncan M.W. Mass spectrometric identification and quantification of hemorphins extracted from human adrenal and pheochromocytoma tissue. *J. Neurochem.*, 68, 1712-1719, 1997.
21. Cohen M., Fruitier-Arnaudin I., Piot J.M. Hemorphins: substrate and/or inhibitors of dipeptidyl peptidase IV. Hemorphins N-terminus sequence influence on the interaction between hemorphins and DPPIV. *Biochimie*, 86, 31-37, 2004.
22. Dagouassat N., Garreau I., Sannier F., Zhao Q., Piot J. M. Generation of VV-hemorphin-7 from globin by peritoneal macrophages. *FEBS Lett.*, 382, 37-42, 1996.

23. M. Day, P.A. Olson, J. Platzter, J. Striessnig, D.J. Surmeier, Stimulation of 5-HT(2) receptors in prefrontal pyramidal neurons inhibit Ca(v)1.2 L type Ca (2+) currents via PLCbeta/IP3/calcineurin signaling cascade, *J. Neurophysiol.*, 87, 2490-2504, 2002.
24. Dunn A.J. Interactions between the nervous system and the immune system: Implications for psychopharmacology, in: Bloom F.E., and Kupfer D.J. (eds) *Psychopharmacology: The Fourth Generation o Progress* Raven Press, NY, pp. 719-731, 1995.
25. Glamsta E.-L., Maklund A., Hellman U., Wernstedt Ch., Terenius L., Nyberg F. Isolation and characterization of hemoglobin derived peptides from the human pituitary gland. *Regul. Peptides* 34, 169-179, 1991.
26. Guan J.-L., Wang Q-P., Lu S., Shioda S. Reciprocal relationships between angiotensin II-containing neurons and enkephalinergic neurons in the rat area postrema. *Synapse*, 41, 112-117, 2001.
27. Hens J. J. H., De Wit M., Ghijsen W. E. J. M., Leenders A. G. M., Boddeke H.W.G. M., Kissmehl R., Wiegant V. M. Weller U., Gispen W.-H., and De Graan P.N.E. Role of calcineurin in Ca2+-induced release of catecholamines and neuropeptides. *J. Neurochem.*, 71, 1978-1986, 1998.
28. Huet G., Flipo R.M., Colin C., Janin A., Hemon B., Collyn-d'Hooghe M., Lafyatis R., Duquesnoy B., Degand P. Stimulation of the secretion of latent cysteine proteinase activity by tumor necrosis factor alpha and interleukin-1. *Arthritis Rheum.*, 36, 772-780, 1993.
29. Iwamoto I., Kimura A., Yamazaki H., Nakagawa N., Tomioka H., Yoshida S. Neutral endopeptidase modulates substance P-induced activation of human neutrophils. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 93, 133-138, 1990.
30. Jupp R., A., Richards A., D., Kay J., Dunn B., M., Wyckoff J. B., Samloff. M., Yamamoto K. Identification of the aspartic proteinases from human erythrocyte membranes and gastric mucosa (slow-moving proteinase) as catalytically equivalent to cathepsin E. *Biochem. J.*, 254, 895-898, 1988.
31. Karelina A., A., Philippova M., M., Karelina E., V., Ivanov V., T. Isolation of endogenous hemorphin-related hemoglobin fragments from bovine brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 202, 410-415, 1994.
32. Kudo S., Miyamoto G., Kawano K. Proteases involved in the metabolic degradation of human interleukin-1 β by rat kidney lysosomes. *J. Interferon Cytokine Res*, 19, 361-367, 1999.
33. Lammerich H.-P., Busmann A., Kutzleb Ch., Wendland M., Seiler P., Berger C., Eickelmann P., Meyer M., Forssmann W.-G., Maronde E. Identification and functional characterization of hemorphins VV-H-7 and LVV-H-7 as low-affinity agonists for the orphan bombesin receptor subtype 3. *Br. J. Pharmacol.*, 138, 1431-1440, 2003.
34. Lantz I., Glamsta E.L., Talbäck L., Nyberg F. Hemorphins derived from hemoglobin have an inhibitory action on angiotensin converting enzyme activity. *FEBS Lett.*, 287, 39-41, 1991.
35. Lian Q., Landner D., Magnuson D., Lee J.M. Selective changes of calcineurin (protein phosphatase 2B) activity in Alzheimer's disease cerebral cortex. *Exp. Neurol.*, 167, 158-165, 2001.
36. Maskay A., Ehrhard A., Moniatte M., Guenet C., Tardif C., Tarnus C., Sorokine O., Heintzelmann B., Nay C., Remy J.-M., Higaki J., Van Dorsselaer A., Wagner J., Danzin C., Mamont P. A possible role for cathepsins D, E, and B in the processing of β -amyloid precursor protein in Alzheimer's disease, *Eur. J. Biochem.*, 244, 414-425, 1997.
37. McFarlane S.I., Kumar A., Sowers J.R. Mechanisms by which angiotensin- converting enzyme inhibitors prevent diabetes and cardiovascular disease, *Am. J. ardiol.*, 91 (suppl), 30H-37H, 2003.
38. McGillis J.P., Mitsuhashi M., Payan D.G. Immunologic properties of substance P. In: Ader R., Felten D.L., Cohen, N., eds. *Psychoneuroimmunology*, 2 nd ed. San Diego, Academic Press; pp.209-223, 1991.
39. Moeller I., Lew R.A., Mendelsohn F.A.O., Smith A.I., Brennan M.E., Tetaz T.J., Chai S.Y. The globin fragment LVV-Hemorphin-7 is an endogenous ligand for the AT4 receptor in the brain. *J. Neurochem.*, 68, 2530-2537, 1997.

40. Moisan S., Harvey N., Beaudry G., Forzani P., Burhop K.E., Drapeau G., Rioux F. Structural requirements and mechanism of the pressor activity of Leu-Val-Val- hemorphin-7, a fragment of hemoglobin β -chain in rats. *Peptides*, 19, 119-131, 1998.
41. Nyberg F., Sanderson K., Glamsta E.L. The hemorphins: a new class of opioid peptides derived from the blood protein haemoglobin. *Biopolymers*, 43, 147-156, 1997.
42. Odaka C., Mizuochi T. Angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril prevents activation-induced apoptosis by interfering with T cell activation signals, *Clin. Exp. Immunol.*, 121, 515-522, 2000.
43. Ohyagi Y., Yamada T., Goto I. Hemoglobin as a novel protein developmentally regulated in neurons. *Brain Res.*, 635, 323-327, 1994.
44. Palkovits M. Stress-induced expression of co-localized neuropeptides in hypothalamic and amygdaloid neurons. *Eur. J. Pharmacol.*, 405, 161-166, 2000.
45. Poljak A., McLean C.A., Sachdev P., Brodaty H., Smythe G.A. Quantification of hemorphins in Alzheimer's disease brains, *J. Neurosci. Res.*, 75, 704-714, 2004.
46. Sanderson K., Nyberg F., Khalil Z. Modulation of peripheral inflammation by locally administered hemorphin-7. *Inflamm. Res.*, 47, 49-55, 1998.
47. Sanderson Nydahl, K., Pierson J., Nyberg F., Caprioli R.M., Andren P.E. In vivo processing of LVV-hemorphin-7 in rat brain and blood utilizing microdialysis combined with electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17, 838-844, 2003.
48. Sarukhanyan F.P. Serotonin 5-HT_{2A} receptors and NMDA glutamate receptors participate in blood glucose-lowering effect of LVVYPW in streptozotocin-induced diabetic rats. *Blood (Ministry Health RA)* 11, 27-31, 2011.
49. Schindler, R., Dinarello, C.A., Koch, K.M. Angiotensin-converting enzyme inhibitors suppress synthesis of tumour necrosis factor and interleukin 1 by human peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine*, 7, 526-533, 1995.
50. Serfling E., Berberich-Siebelt F., Chuvpilo S., Jankevics E., Klein-Hessling S., Twardzik T., Avots A. The role of NF-AT transcription factors in Tcell activation and differentiation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1498, 1-18, 2000.
51. Slemmon J.R., Wengenack T.M., Flood D.G. Profiling of endogenous peptides as tool for studying development and neurological disease. *Biopolymers*, 43, 157-170, 1997.
52. Sorimachi H., Ishiura S., Suzuki K. Structure and physiological function of calpains, *Biochem. J.*, 328, 721-732, 1997.
53. Suzuki J, Bayna E, Li HL et al. Lipopolysaccharide activates calcineurin in ventricular myocytes. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 49, 491-499, 2007.
54. Valentino R.J., Van Bockstaele E. Opposing regulation of the locus coeruleus by corticotropin-releasing factor and opioids. *Psychopharmacology*, 158, 331-342, 2001.
55. Van Bockstalle E.J., Saunders A., Commons K.G., Liu X-B., Peoples J., Evidence for co-existence of enkephalin and glutamate in axon terminals and cellular sites for functional interactions of their receptors in the rat locus coeruleus. *J. Comp. Neurol.*, 417, 103-114, 2000.
56. Yakel J.L. Calcineurin regulation of synaptic function: from ion channels to transmitter release and gene transcription. *TiPS* 18, 124-134, 1997.
57. Yamamoto Y., Ono H., Ueda A., Shimamura M., Nishimura K., Hazato T. Spinorphin as an endogenous inhibitor of enkephalin-degrading enzymes: roles in pain and inflammation, *Curr. Protein Pept. Sci.*, 3, 587-599, 2002.
58. Yamashita T., Kohda Y., Tsuchiya K, Ueno T., Yamashita J., Yoshioka T., Kominami E. Inhibition of ischaemic hippocampal neuronal death in primates with cathepsin B inhibitor CA-074: a novel strategy for neuroprotection based on "calpain-cathepsin hypothesis", *Eur. J. Neurosci.*, 10, 1723-1733, 1998.
59. Yatskin O., N., Philippova M., Blishchenko E., Yu., Karelin A.A., Ivanov V.T. LVV- and VV-hemorphins: comparative levels in rat tissues. *FEBS Lett.* 428, 286-290, 1998.
60. Zhao Q., Garreau I., Sannier F., Piot J.M. Opioid peptides derived from haemoglobin. Hemorphins. *Biopolymers*, 4, 7 5-98, 1997.

Received 13.12.2012



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 1(65), 2013

**ՀԱՋՈՐԴԱԿԱՆ ԵՎ ՊԻՆԳ-ՊՈՆԳ ՄԵԽԱՆԻԶՄՆԵՐՈՎ
ԸՆԹԱՑՈՂ ԵՐԿՍՈՒԲՍՏՐԱՏ ՖԵՐՄԵՆՏԱՑԻՆ
ՌԵԱԿՑԻԱՆԵՐԻ ԿԻՆԵՏԻԿԱՅԻ ԴԻՆԱՄԻԿԱՆ ՈՉ
ՄՐՑԱԿՑԱՑԻՆ ԱՐԳԵԼԱԿՉԻ ՆԵՐԿԱՅՈՒԹՅԱՆ ԴԵՊՏՈՒՄ
Ռ.Ա.ԱԶԻԶՅԱՆ**

*Երևանի պետական լսարան, կենսաֆիզիկայի ամբիոն
rafayelazizyan@ysu.am*

Ուսումնասիրվել են ոչ մրցակցային արգելակիչների ներկայությամբ հաջորդական և պինգ-պոնգ մեխանիզմներով ընթացող երկուստրատ ֆերմենտային ռեակցիաները՝ համակարգչային մոդելավորման միջոցով: Մոդելների փորձարկումներն իրականացնելու համար օգտագործվել են “Mathematica 7” և “STELLA” դինամիկ մոդելավորման փաթեթները: Ցույց է տրված, որ միևնույն կինետիկ պարամետրերի դեպքում, ոչ մրցակցային արգելակիչն ավելի մեծ արգելակման էֆեկտ է դրսևորում պինգ-պոնգ մեխանիզմով ընթացող ռեակցիայի դեպքում: Բացի այդ, ցույց է տրված, որ արգելակիչի կոնցենտրացիայի փոփոխման դեպքում արգասիքի առաջացման դինամիկայում տեղի ունեն էական փոփոխություններ:

*Երկուստրատ ֆերմենտային ռեակցիաներ – հաջորդական մեխանիզմ –
պինգ-պոնգ մեխանիզմ – համակարգչային մոդելավորում*

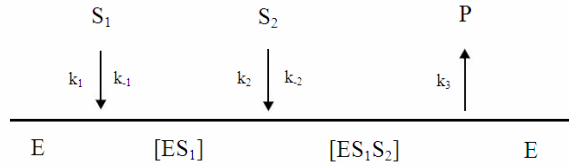
Исследованы двусубстратные ферментативные реакции, протекающие последовательным и пинг-понг механизмами в присутствии неконкурентного ингибитора методом компьютерного моделирования. Для осуществления вышеупомянутых реакций были использованы компьютерные пакеты динамического моделирования “STELLA” и “Mathematica 7” Software. Показано, что влияние неконкурентного ингибитора сильнее выражено для реакций, протекающих пинг-понг механизмом. Кроме того, было показано, что при изменении концентрации ингибитора выявляются заметные сдвиги в динамике выхода продукта.

*Двусубстратные ферментативные реакции – последовательный механизм – пинг-понг
механизм – компьютерное моделирование*

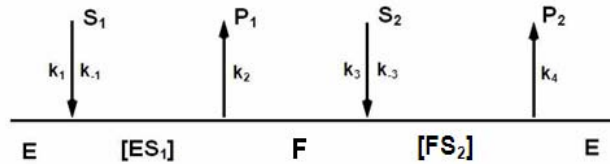
This study deals with computer-based modeling of bi-substrate enzymatic reactions with ping-pong and sequential mechanisms in the presence of non-competitive inhibitor. Simulations of above-mentioned reaction have been carried out using “Mathematica 7” Software and “STELLA” dynamic modeling package. According to the results, obtaining from simulation data, inhibition effects of non-competitive inhibitor appeared to be more effective in the case of ping-pong mechanism. Besides, it is shown that changes in concentration of non-competitive inhibitor lead to significant changes in the dynamics of product generation.

Bi-substrate enzymatic reactions – ping-pong mechanism – sequential mechanism – computer modeling

Երկուստրատ ֆերմենտային ռեակցիաները լայն տարածում ունեն կենսաքիմիական մետաբոլիկ ուղիներում [11, 13, 15]: Հայտնի են այդ ռեակցիաների մի քանի մեխանիզմներ, որոնցից են հաջորդական և պինգ-պոնգ մեխանիզմներով ընթացող ֆերմենտային ռեակցիաները: Հաջորդական մեխանիզմի դեպքում ռեակցիայի արգասիքն անջատվում է միայն ֆերմենտի հետ բոլոր սուբստրատների կապվելուց հետո, ինչը ներկայացված է ստորև բերված սխեմայում [14]:



Ի տարբերություն հաջորդական մեխանիզմի, պինգ-պոնգ մեխանիզմի դեպքում տեղի է ունենում արգասիքի անջատում մինչև բոլոր սուբստրատների կապվելը: Սուբստրատների կապման հաջորդականությունից կախված, պինգ-պոնգ մեխանիզմով ընթացող ֆերմենտային ռեակցիաները բաժանվում են երկու խմբի՝ խառը (կամ պատահական) և կարգավորված: Վերջին դեպքում սուբստրատները կապվում են խիստ որոշակի հերթականությամբ: Համաձայն ֆերմենտային ռեակցիաների Կլեյանդի սխեմատիկ պատկերման, ֆերմենտի տարբեր վիճակները կարող են ներկայացվել հորիզոնական գծի միջոցով, իսկ սուբստրատները և արգասիքները՝ ուղղահիգ պաթներով [5, 7]: Հետևաբար, կարգավորված պինգ-պոնգ մեխանիզմով ընթացող ֆերմենտային ռեակցիայի համար կունենանք հետևյալ սխեման՝



որտեղ k_1 ; k_2 ; k_3 ; k_4 և k_{-1} ; k_{-2} ; k_{-3} -ը համապատասխանաբար ուղիղ և հետադարձ ընթացող ռեակցիաների լուրջ արագության գործակիցներն են, E-ն՝ ազատ ֆերմենտն է, S_1 -ն ու S_2 -ը համապատասխանաբար առաջին և երկրորդ սուբստրատներն են, $[ES_1]$ -ը և $[FS_2]$ -ը կրկնակի կոմպլեքսներն են, F-ը ֆերմենտի մոդիֆիկացված միջանկյալ ձևն է և P-ն արգասիքն է [2]:

Դիտարկելով այն հիմնական դեպքը, երբ հետադարձ ռեակցիաների արագության գործակիցները զգալիորեն զիջում են առաջընթաց ռեակցիաների գործակիցներին և, հաշվի առնելով հավասարակշռական վիճակը, կարելի է ստանալ հետևյալ հավասարումները հաջորդական (1) և պինգ-պոնգ (2) մեխանիզմներով ընթացող ռեակցիաների արագության համար՝

$$v = \frac{k_3 \times E}{1 + \frac{K_1}{S_1} + \frac{K_1 K_2}{S_1 \times S_2}}$$

$$v = \frac{k_2 \times E}{1 + \frac{K_1}{S_1} + \frac{k_2}{k_4} \left(1 + \frac{K_2}{S_2}\right)}$$

որտեղ K_1 -ը և K_2 -ը համապատասխանաբար S_1 և S_2 սուբստրատների կապման հաստատուններն են [1]:

Աշխատանքում հետազոտվել է նշված մեխանիզմներով ընթացող ռեակցիաների արգասիքների ելքը միջավայրում ոչ մրցակցային արգելակչի տարբեր կոնցենտրացիաների առկայության դեպքում:

Նյութ և մեթոդ: Աշխատանքում օգտագործվել են երկու տարբեր համակարգչային փաթեթներ, հաջորդական և պինգ-պոնգ մեխանիզմներով ընթացող երկսուբստրատ ֆերմենտային ռեակցիաների ոչ մրցակցային արգելակչի երկու մոդելների կառուցման և փորձարկման համար: Մասնավորապես, մոդելավորումն կատարվել է “STELLA” համակարգչային փաթեթի, ինչպես նաև “Mathematica” ծրագրային փաթեթի միջոցով [9,12]:

Մոդելները ստացվել են համապատասխան ռեակցիաները նկարագրող դիֆերենցիալ հավասարումների համակարգի հիման վրա: Մոդելներում օգտագործվել են հետևյալ կինետիկ պարամետրերի սկզբնական արժեքները: Ոչ մրցակցային արգելակչի մոդելների հետագա ներկայացման համար օգտագործել են հետևյալ նշանակումները՝

Պինգ-պոնգ մեխանիզմով ընթացող ֆերմենտային ռեակցիայի մոդել – PPMd
Հաջորդական մեխանիզմով ընթացող ֆերմենտային ռեակցիայի մոդել – SQMd

$E_0=10 \mu\text{mol}$	$k_1=2 \times 10^{-3} (\text{sec})^{-1}$	$k_{-1}=1 \times 10^{-3} (\text{sec})^{-1}$
$S_1=300 \mu\text{mol}$	$k_2=5 \times 10^{-3} (\text{sec})^{-1}$	$k_i = 1 \times 10^{-3} (\text{sec})^{-1}$
$S_2=310 \mu\text{mol}$	$k_3=3 \times 10^{-3} (\text{sec})^{-1}$	$k_{-3}=1.5 \times 10^{-3} (\text{sec})^{-1}$
$I_1=30, I_2=15, I_3=5 \mu\text{mol}$	$k_4=5 \times 10^{-3} (\text{sec})^{-1}$	$k_{-4}=7 \times 10^{-4} (\text{sec})^{-1}$

Վերը նշված բոլոր մոդելների համար փորձարկվել է ինհիբիտորների սկզբնական կոնցենտրացիաներով երեք տարբեր արժեքներ: Մասնավորապես, դիտարկվել է ֆերմենտ/ինհիբիտոր հարաբերության հետևյալ երեք դեպքերը՝ $[E]_0/[I]=1/3$; $[E]_0/[I]=2/3$ և $[E]_0/[I]=2$:

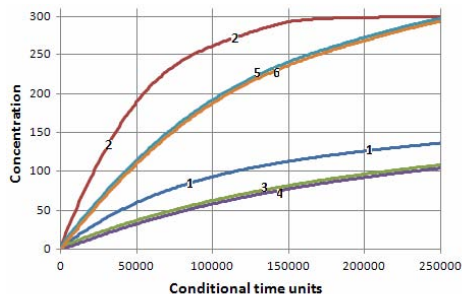
Արդյունքներ և քննարկում: Ոչ մրցակցային արգելակչի ներկայությամբ մոդելների փորձարկումից ստացված տվյալների հիման վրա կառուցվել են արգասիքների ելքի դինամիկան բնորոշող կինետիկ կորեր, որոնք ներկայացված են նկ.1-ում:

Ինչպես կարելի է տեսնել, միևնույն կինետիկ պարամետրերի դեպքում հաջորդական մեխանիզմով ընթացող երկուփուստրատ ֆերմենտային ռեակցիայի արգասիքի ելքի արագությունը ավելի մեծ է պինգ-պոնգ մեխանիզմի արգասիքի ելքի արագությունից: Այս նույն օրինակափությունը պահպանվում է նաև արգելակչի տարբեր կոնցենտրացիաների դեպքում: SQMd և PPMd մոդելների փորձարկման ժամանակահատվածի տևողությունը կազմել է 250.000 պայմանական ժամանակային միավոր:

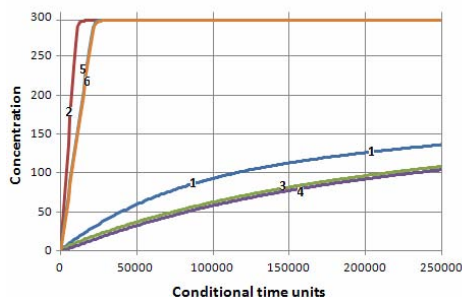
Ոչ մրցակցային արգելակչի կոնցենտրացիան կիսով չափ նվազեցնելու արդյունքում արգասիքի ելքի դինամիկան կտրուկ փոփոխության է ենթարկվում: Այս արգելակչի ներկայությամբ մոդելում արգասիքի առաջացման արագությունը թե հաջորդական մեխանիզմի, և թե պինգ-պոնգ մեխանիզմի դեպքում կտրուկ մեծանում է:

Պինգ-պոնգ մեխանիզմի դեպքում առաջին և երկրորդ արգասիքների ելքի արագությունը, երբ $[I]=15 \mu\text{mol}$, բնական է, գերազանցում է հաջորդական մեխանիզմի արգասիքի ելքի արագությանը, երբ $[I]=30 \mu\text{mol}$ (նկ. 1,2):

ա

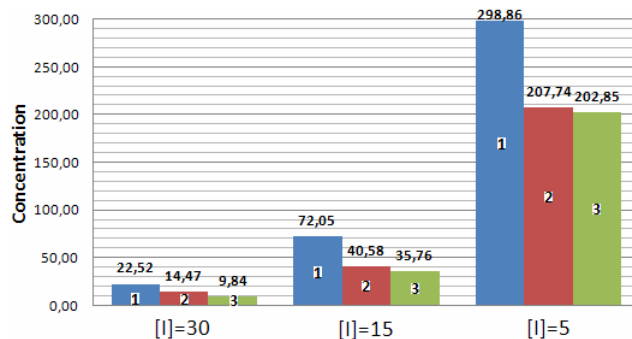


բ



Նկ. 1. Հաջորդական և պինգ-պոնգ մեխանիզմներով ընթացող երկուփուստրատ ֆերմենտային ռեակցիաների համեմատական կինետիկան ոչ մրցակցային արգելակչի առկայության դեպքում: ա/արգելակչի կոնցենտրացիաների արժեքները կազմում են $30 \mu\text{mol}$ և $15 \mu\text{mol}$, բ/ արգելակչի կոնցենտրացիաները կազմում են՝ $30 \mu\text{mol}$ և $5 \mu\text{mol}$: Կոր 1 և 2՝ արգելակչի տարբեր կոնցենտրացիաների դեպքում հաջորդական մեխանիզմով ընթացող ֆերմենտային ռեակցիայի P արգասիքի ելք, կոր 3 և 5՝ պինգ-պոնգ մեխանիզմով ընթացող ֆերմենտային ռեակցիայի առաջին P₁ արգասիքի ելք, կոր 4 և 6՝ պինգ-պոնգ մեխանիզմով ընթացող ֆերմենտային ռեակցիայի երկրորդ P₂ արգասիքի ելք:

Ոչ մրցակցային արգելակչով մոդելների համար արգասիքի դինամիկան գլխավորապես կախված է ոչ մրցակցային արգելակչի կոնցենտրացիայից: Ինչպես և սպասվում էր, արգելակչի կոնցենտրացիան նվազեցնելով մինչև $[I]=5$ բոլ-ի, արգելակման էֆեկտի թուլացումը ավելի ակնհայտ է դառնում: Այդ դեպքում երկու մեխանիզմների կինետիկան ավարտվում է, երբ դեռ արգասիքների առավելագույն քանակի ընդամենը 7,5-12%-ն է առաջացել նույն մոդելներում արգելակչի՝ $[I]=30$ բոլ արժեքով կոնցենտրացիայի դեպքում: Արգելակչի նվազագույն կոնցենտրացիայի դեպքում հաջորդական մեխանիզմով ընթացող ֆերմենտային ռեակցիայի կինետիկայի ավարտի պահը ընտրելով որպես համեմատության կետ, կառուցվել են հիստոգրամներ, արգասիքների ելքը գնահատելու համար (նկ.2):



Նկ. 2. Արգելակչի տարբեր կոնցենտրացիաների դեպքում ոչ մրցակցային արգելակչի ներկայությամբ հաջորդական և պինգ-պոնգ մեխանիզմներով ընթացող երկսուբստրատ ֆերմենտային ռեակցիաների արգասիքների կոնցենտրացիաների համեմատական պատկերը 15.000-րդ պայմանական ժամանակային միավորի պահին: 1՝ հաջորդական մեխանիզմով ընթացող ֆերմենտային ռեակցիայի P արգասիքի ելք, 2՝ պինգ-պոնգ մեխանիզմով ընթացող ֆերմենտային ռեակցիայի առաջին P1 արգասիքի ելք, 3՝ պինգ-պոնգ մեխանիզմով ընթացող ֆերմենտային ռեակցիայի երկրորդ P2 արգասիքի ելք:

Ինչպես երևում է նկ.-2-ից, արգելակիչների կոնցենտրացիայի ավելացումը բերում է արգասիքի ելքի կտրուկ անկման և արգելակիչների կոնցենտրացիաների բոլոր արժեքների դեպքում հաջորդական մեխանիզմով ընթացող ռեակցիայի արգասիքի ելքը միշտ մեծ է պինգ-պոնգ մեխանիզմով ընթացողների արգասիքների ելքից: Արգելակման այսպիսի բարձր էֆեկտը բացատրվում է նրանով, որ ոչ մրցակցային արգելակիչը կարող է կապվել ֆերմենտի բոլոր ձևերին, թե ազատ վիճակում գտնվող ֆերմենտին, թե՛ սուբստրատների հետ կոմպլեքս ձևավորված վիճակում գտնվող ֆերմենտի մոլեկուլներին [3, 6, 10]:

Ոչ մրցակցային արգելակչի ներկայությամբ մոդելներում կարելի է գտնել արգելակիչների այնպիսի կոնցենտրացիաների համադրություն, երբ երկու մեխանիզմների դեպքում էլ արգասիքների ելքի արագությունները հավասար լինեին կամ որևէ մեխանիզմով ընթացող ռեակցիայի արագությունը գերակշռի մյուսի ռեակցիայի արագությանը: Փաստորեն ստացվում է, որ արգելակիչների կոնցենտրացիաների որոշակի արժեքների ընտրության միջոցով հնարավոր է կարգավորել տվյալ ռեակցիայի ընթացքը, ինչպես նաև այն բարդ բազմափուլ կենսաքիմիական վերափոխումների ընթացքը, որոնցում ընթանում են այդ ռեակցիաները [6, 8]:

Այսպիսով, ոչ մրցակցային արգելակչի ներկայությամբ նշված երկու մեխանիզմներով ընթացող ռեակցիաների մոդելների փորձարկումից ստացված արդյունքները վկայում են, որ մինևույն կինետիկ պարամետրերի դեպքում ոչ մրցակցային արգելակիչն ավելի մեծ արգելակման էֆեկտ է դրսևորում պինգ-պոնգ մեխանիզմով ընթացող ռեակցիաների դեպքում: Փոփոխելով արգելակչի կոնցենտրացիայի արժեքները, կարելի է եզրակացնել, որ հաջորդական մեխանիզմով ընթացող ռեակցիաների արգասիքի ելքը միշտ մեծ է պինգ-պոնգ մեխանիզմով ընթացող ռեակցիաների արգասիքների ելքից:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. *Варфоломеев, С.Д., Гуревич, К.Г.* Биокинетика, М., 716 с., 1999.
2. *Келети Т.* Основы ферментативной кинетики, Мир, М., 348 с., 1990.
3. *Azizyan R.A., Gevorgyan A.E., Arakelyan V.B., Gevorgyan E.S.* Computational modeling of kinetics of the Bisubstrate enzymatic reaction with ping-pong mechanism. *Biolog. Journal of Armenia*, 64, 2, pp85-93, 2012.
4. *Azizyan R.A., Gevorgyan A.E., Arakelyan V.B., Gevorgyan E.S.* Computational modeling of kinetics of the bisubstrate enzymatic reaction with sequential mechanism. *Electronic Journal of Natural Sciences*, Issue1, 18, pp. 3-12, 2012.
5. *Bisswanger H.* Enzyme kinetics. Principles and Methods. (2nd edition), WILEY-VCH, 301 p., 2008.
6. *Bugg, C.E., Carson, W.M., and Montgomery, J.A.* Drugs by design. *Sci. Am.* 269, 6, 92-98, 1993.
7. *Cleland W.W.* The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. I. Nomenclature and rate equations. *Biochim. Biophys. Acta*, 67, 104-137, 1963.
8. *Cornish-Bowde, A.* Enzyme kinetics from a metabolic perspective. *Biochem. Soc. Trans.* 27, 281-284, 1999.
9. *Moran L.A., Horton H.R., Scrimgeour K.G., Perry M.D.* Principles of Biochemistry, 5th ed., Pearson, 786 p., 2012.
10. *Sidhu, R., Blair, H.* Human Liver Aldehyde Dehydrogenase. *The J. Biol. Chemistry*, 250, 7899-7904, 1975.
11. *Yao C., Lai C., Hsieh H., Chi C., Yin Sh.* Establishment of steady-state metabolism of ethanol in perfused rat liver: the quantitative analysis using kinetic mechanism-based rate equations of alcohol dehydrogenase. *Alcohol*, 44, 541-551, 2010.
12. *Yon-Kahn, J., Herve, G.* Molecular and Cellular Enzymology, 1, Springer, 783, 2010.
13. *Yuan, H., Fu G., Brooks, Ph., Weber, I., Gadda, G.* Steady-State Kinetic Mechanism and Reductive Half-Reaction of D-Arginine Dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry*, 49, 9542-9550, 2010.
14. "Mathematica 7" Home page available at URL: <http://www.wolfram.com/products/mathematica/newin7>
15. "STELLA Home Page" available at URL: <http://www.iseesystems.com/software/Education/StellaSoftware.aspx>

Ստացվել է 21.11.2012



Биолог. журн. Армении, 1 (65), 2013

ПОЛОВАЯ СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИИ СЕРЕБРЯНОГО КАРАСЯ, ИНТРОДУЦИРОВАННОГО В ВОДОЕМЫ РАЗЛИЧНЫХ ПРИРОДНО- КЛИМАТИЧЕСКИХ ЗОН

Б.К. ГАБРИЕЛЯН¹, В.К. РИЗЕВСКИЙ², А.В. ЗУБЕЙ²,
БАРСЕГЯН¹, Т.В. ВАРДАНИЯН¹

Н.Э.

¹ Научный центр зоологии и гидроэкологии НАН РА,

² ГНПО «НПЦ НАН Беларуси по биоресурсам»

В период с июня по октябрь 2011 года были проведены исследования популяций серебряного карася трех модельных водоемов Беларуси – озер Черное, Лисно и Белое-Котлярово, а также в озере Севан в Армении. Сравнительный анализ половой структуры серебряного карася из оз. Севан показал, что в отличие от озер Беларуси, самцы здесь присутствовали во всех возрастных группах. По количеству самцов карася озеро Севан занимает промежуточное положение между белорусскими озерами – Черное и Белое-Котлярово, что, с одной стороны, свидетельствует об ухудшении условий обитания, связанных с загрязнением или нестабильной обеспеченностью кормом, с другой – усилением действий адаптивных свойств популяции в изменяющихся условиях среды.

Серебряный карась – половая структура – водоемы Беларуси – оз. Севан

2011 թ. հունիսից հոկտեմբեր ամիսներին կատարվել են արձաթափայլ լճածածանի (կարասի) պոպուլյացիայի ուսումնասիրություններ Բելառուսի 3 մոդելային ջրամբարներում՝ Չոռնոե, Լիսնո և Բելոյե-Կոտլյարովո լճերում, ինչպես նաև Հայաստանում՝ Սևանա լճում: Արձաթափայլ լճածածանի սեռային կառուցվածքի համեմատական վերլուծությունը ցույց է տվել, որ ի տարբերություն Բելառուսի լճերի, Սևանա լճում բոլոր տարիքային խմբերում հանդիպել են արու առանձնակներ: Լճածածանի արու առանձնակների թվաքանակով Սևանա լիճը միջանկյալ դիրք է զբաղեցնում Բելառուսի Չոռնոյե և Բելոյե-Կոտլյարովո լճերի միջև, որը մի կողմից վկայում է բնակության պայմանների վատացման մասին՝ կախված աղտոտման կամ սննդի ոչ կայուն ապահովման հետ, իսկ մյուս կողմից՝ փոփոխվող պայմաններում լճածածանի պոպուլյացիայի հարմարվողական հատկությունների ուժեղացման մասին:

Արձաթափայլ լճածածան – սեռային կառուցվածք – Բելառուսի ջրամբարներ – Սևանա լիճ

The populations of Crucian Carp were studied in 3 model reservoirs in Belarusian lakes Chernoe, Lisno, Beloe-Kotlyarovo, and in Lake Sevan, Armenia during June-October 2011. The comparative analysis of sexual structure of Crucian Carp has shown that, in difference with Belarusian lakes, male species in Lake Sevan are present in all age groups. Lake Sevan has a medium position between lakes Chernoe and Beloe-Kotlyarovo in terms of the quantity of male species of Crucian Carp. On one hand it indicates a deterioration of living conditions due to pollution or not sustainable food supply, and on the other hand it shows the strengthening of adaptive characteristics of Crucian Carp population in variable conditions.

Crucian carp – sexual structure – reservoirs of Belarus – Lake Sevan

Своеобразие динамики соотношения полов у *Carassius auratus gibelio* (Bloch., 1783) является одной из наиболее ярких особенностей этого вида. Половой состав популяций из различных водоемов ареала, охватывающего значительную часть Европы и Азии, сильно варьирует. У серебряного карася, обитающего в водоемах Восточной Азии, популяции состоят из самцов и самок, что обеспечивает нормальное осеменение икры в ходе нереста. В Средней Азии, Западной Сибири и Европе в популяциях этого вида рыб самцы встречаются крайне редко, а в некоторых отсутствуют совсем [15]. Высокая биологическая пластичность позволяет серебряному карасю существовать как в популяциях с равным соотношением полов, так и в популяциях с абсолютным доминированием самок. Соотношение полов является важным показателем, в определенной степени свидетельствующим о преобладающем типе размножения: гинохроническом или гиногенетическом [2].

В случае отсутствия самцов в популяции серебряного карася размножение происходит путем естественного гиногенеза с участием самцов других видов [9]. Серебряный карась представлен двумя формами – диплоидной (размножающейся обычным бисексуальным способом ($2n=100$)) и триплоидной (размножающейся гиногенетическим способом ($3n=150$)), которые различаются по типу размножения, обитают симпатрично [1, 3, 4, 8, 11] и морфологически почти не различаются [6, 7, 21, 23].

В настоящее время в естественных водоемах и водотоках Беларуси одним из основных промысловых видов рыб является серебряный карась. Начиная с 2006 г. (начало реализации мероприятий “Республиканской программы развития рыбной отрасли на 2006-2010 годы”) по настоящее время, доля его в общем объеме изъятия рыбы промыслом колеблется от 10,4 % (2007 г.) до 17,7% (2009 г.). При этом следует отметить, что данный вид не является аборигеном фауны рыб Беларуси, а относится к видам-акклиматизантам, преднамеренно вселенным в водоемы Беларуси для повышения их рыбопродуктивности.

По имеющейся в научной литературе информации [10, 12, 13, 20] акклиматизация серебряного карася в Беларуси проводится с 1948 г. Исходный материал был получен из бассейна р. Амур (1000 производителей) и из Саввинского рыбопитомника (1200 производителей). Обе группы производителей успешно перезимовали в прудовых хозяйствах и в 1949 г. дали обильное потомство, которое явилось базой для широкого расселения серебряного (амурского) карася по различным водоемам Армении.

Ранее отмечалось, что в оз. Севан популяция серебряного карася представлена одними самками, и доля самцов в них не превышает 0,9-1%. В бухтах количество самцов увеличивалось по сравнению с самим озером и достигло максимума в приустьевых участках его притоков [20].

Кареологический анализ показал, что в оз. Севан обитают однополо-диплоидная и диплоидно-бисексуальная формы карася [19].

По мнению ряда авторов, главными причинами изменения соотношения полов у рыб, как и у других животных, является обеспеченность пищей и качество пищи. При лучших условиях откорма соотношение сдвигается в пользу самок, а при худших – возрастает количество самцов, что было отмечено, например, у карася обыкновенного *Carassius carassius* Linnaeus (1758) в озерах бассейна р. Печоры [16].

В рамках выполнения темы “Оценка состояния популяций серебряного карася, интродуцированного в водоемы различных природно-климатических зон, и пути устойчивого использования его промысловых запасов” в период с июня по октябрь 2011 года были проведены обследование и сравнительный анализ популя-

ций серебряного карася трех модельных водоемов – оз. Черного, территориально находящегося в Березовском районе Брестской области, озер Лисно и Белое-Котлярово, расположенных в Верхнедвинском и Россонском районах Витебской области, в Армении – оз. Севан. Сравнение соотношения полов карася из водоемов с различными условиями обитания вызывает определенный научный интерес, что позволяет выявить закономерности компенсаторных реакций популяции на те или иные факторы среды.

Материал и методика. Сбор ихтиологического материала по оз. Севан был проведен в течение летних месяцев 2011 г. на территории близ с. Цовазард, Гилли, г. Севан, с. Чкаловка и устье р. Дзкнагет. Отлов рыб производился с использованием ручного накидного невода, экрана и ставных сетей. Было исследовано 719 экз. серебряного карася, из которых половозрелыми были 346 особей. Размеры исследованных рыб колебались от 3,3 см до 23,5 см, масса – от 1,0 г до 249,0 г.

Отбор ихтиологического материала в Березовском районе Беларуси проводили из промысловых уловов рыбаков, в качестве снастей были использованы ставные сети общей длиной 1000 м с ячейей 40-85 мм. Было обследовано 259 рыб, принадлежащих к 10 возрастным группам (от 1 до 11 лет). Размеры карасей колебались от 13 см длины и 78,0 г массы до 36 см длины и 1872 г массы, самый крупный экземпляр весил 1940 г при длине 32 см.

Был проведен полный биологический анализ рыб во всех исследуемых водоемах. Каждую рыбу предварительно измеряли (длина тела до конца чешуйного покрова – l и длина до конца хвостового плавника – L), взвешивали (общая масса тела – G и масса без внутренностей – g) определяли пол, стадию зрелости половых продуктов и возраст [5, 14, 16, 17, 22].

Результаты и обсуждение. Водоемы Беларуси

оз. Черное.

Улов серебряного карася из этого водоема составил 94 особи. Рыбы из промысловых уловов были представлены 7 возрастными группами (длина рыб 13-34 см, масса – 78-926 г). В результате исследования половой структуры популяции серебряного карася оз. Черное были выявлены самцы в возрасте 3-4 лет, доля которых составила 62,6 % для 3 годовиков (максимальная доля самцов) и 20% – 4 годовиков. В остальных возрастных группах самцы выявлены не были (рис. 1).

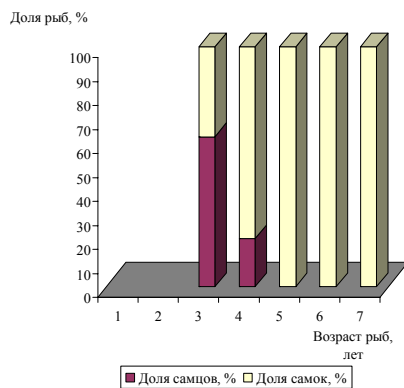


Рис. 1. Половая структура серебряного карася, оз. Черное

оз. Лисно

Озеро облавливали троекратно, в результате чего было собрано и исследовано 139 экз. рыб, возрастом от 3 до 11 лет, длина их колебалась от 15 до 36 см, а масса – от 100 до 1940 г. Половая структура популяции серебряного караса оз. Лисно, так же как и оз. Черное, представлена обоими полами, самцы выявлены для возрастных групп 3-9 лет (5 групп), доля их колебалась от 50 % для группы 9 лет (максимальная доля самцов) до 1,6 % для группы 6 лет. В остальных возрастных группах самцы выявлены не были (рис. 2).

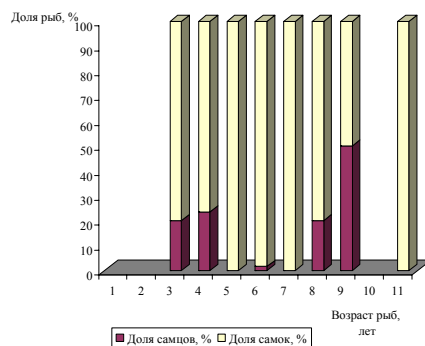


Рис. 2. Половая структура серебряного караса, оз. Лисно

оз. Белое-Котлярово

Несмотря на два облова вышеупомянутого озера, серебряный карась в промысловых уловах был представлен немногочисленно: 26 особями, относящимися к 4 возрастным группам (2-7 лет). Длина рыб колебалась от 15 до 27 см, масса от 148 до 710 г. Популяция серебряного караса озера Белое-Котлярово, как и популяции этой рыбы двух вышеупомянутых водоемов является двуполой, самцы выявлены для 2 возрастных групп – 3 и 6 лет. В возрастной группе 3 года самцы составляли 11,1 %, а самец в возрасте 6 лет был единственным в своей возрастной группе (100%) (рис. 3).

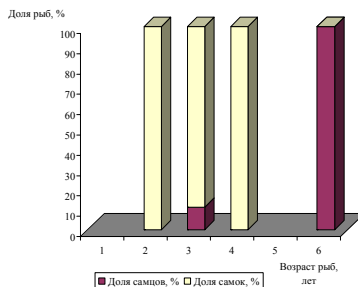


Рис. 3. Половая структура серебряного караса, оз. Белое-Котлярово

Армения - оз. Севан

У серебряного караса из оз. Севан наблюдается необычное соотношение полов. Как правило, самцы встречаются намного реже, чем самки. Лишь на одной из станций наблюдений оба пола встречались в равном количестве. На разных станциях

наблюдений среди половозрелых особей соотношение полов было разным, что указывает на локальность отдельных популяций карася в лимносистеме Севана (табл. 1).

Табл. 1. Соотношение полов среди половозрелых особей *Carassius auratus gibelio* в оз. Севан

Пункт выборки	♂:♀
Близлежащая затопленная территория с. Цовазард	1:1
Близлежащая водная территория с. Чкаловка	1:2,3
Близлежащая водная территория Гилли	1:9
Близлежащая водная территория г. Севан	1:3,3
Канал р. Раздан	1:1,7
р. Дзкнагет (в июне)	1:0

Результаты исследований показали, что соотношение самок и самцов карася на исследуемых станциях в среднем было равно 2,9:1. На территории с. Цовазард, вследствие повышения уровня воды озера, на затопленных станциях самцы и самки находились в равных соотношениях. В устье р. Дзкнагет в июне 2011г. в уловах встречались только самцы. В канале р. Раздан количество самцов в популяции было больше, чем на остальных станциях (за исключением р. Дзкнагет и близлежащей затопленной территории Цовазард).

Анализ половой структуры популяции серебряного карася оз. Севан в исследуемый период показал, что, в отличие от озер Беларуси, самцы присутствуют во всех возрастных группах (рис. 4).

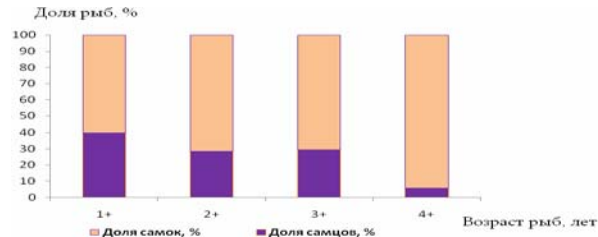


Рис.4. Половая структура серебряного карася оз Севан по возрастам

В бассейне оз. Севан серебряный карась достигает половой зрелости в возрасте 2+, 3 лет. Караси почти полностью (96-98 %) становятся половозрелыми в возрасте 3 лет. Среди самцов в возрасте 2-х лет половозрелые особи были представлены лишь единичными экземплярами. Рыбы в возрасте 3-х лет и старше были представлены только половозрелыми особями.

В результате исследований в 2011 г. было установлено, что в популяциях серебряного карася оз. Севан доля самцов колеблется в пределах 10,0-50,0 %, в среднем 25,8 %.

За период исследований в водоемах Беларуси количество самцов в разных возрастных группах серебряного карася из озер Черное, Лисно и Белое-Котлярово было незначительно – 42 экз.

Доли самцов в каждом модельном водоеме существенно различались. Наибольшая доля самцов в популяции серебряного карася оз. Черного – 37,6% от общего количества самцов в популяциях исследованных водоемов (рис. 5).

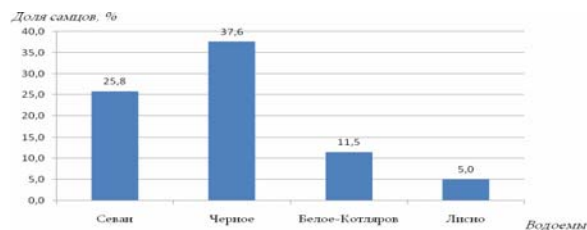


Рис.5. Доля самцов в популяциях исследованных водоемов Беларуси и Армении

Учитывая, что изменение структуры популяций рыб носит приспособительный характер, можно предположить, что рост количества самцов в популяциях серебряного карася, с одной стороны, свидетельствует об ухудшении кормовой базы и связан с прогрессирующим загрязнением, а с другой – о том, что в меняющихся условиях обитания, когда усиливается действие естественного отбора, для серебряного карася предпочтительнее участие в процессе размножения самцов собственного вида, так как при этом потомство имеет больше шансов на выживание в силу своей генетической разнокачественности.

Таким образом, сравнительный анализ половой структуры серебряного карася из водоемов Беларуси и оз. Севан показал, что по количеству самцов карася оз. Севан занимает среднее положение между озерами Черное и Белое-Котлярово в Беларуси, что может свидетельствовать о нестабильности условий обитания карася в озерах Севан, Черное, Белое-Котлярово.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абраменко М.И., Кравченко О.В., Великоиваненко А.Е. Генетическая структура популяций в диплоидно-триплоидном комплексе серебряного карася *Carassius auratus gibelio* в бассейне Нижнего Дона. *Вопр. ихт.*, 37, 1, с. 62-71, 1997.
2. Апаликова О.В. Филогеография плоидности и митохондриальной ДНК у серебряного карася *Carassius auratus gibelio* в популяциях Евразии. *Чтения памяти В.Я. Леванидова*, вып. 4, с. 389-397, 2008.
3. Бельченко Л.А. Биохимический полиморфизм в дальневосточных популяциях серебряного карася. *Экологическая физиология и биохимия рыб. Тез. докл. Всероссийской конференции*, Ярославль, 1, с. 28-29, 2000.
4. Брыков Вл. А., Апаликова О.В., Елисейкина М.Г., Ковалев Ю.М. Изменчивость митохондриальной ДНК у диплоидной и триплоидной форм серебряного карася *Carassius auratus gibelio*, II *Генетика*, 41, 6, с. 811-816, 2005.
5. Брюзгин В.Л. Методы изучения роста рыб по чешуе, костям и отолитам. Киев, Наукова Думка, 187с., 1969.
6. Васильева Е.Д. О морфологической дивергенции гиногенетической и бисексуальной форм серебряного карася *Carassius auratus* (Cyprinidae, Pisces). *Зоологический журнал*, 69, 11, с. 97-110, 1990.
7. Васильева Е.Д., Васильев В.П. К проблеме происхождения и таксономического статуса триплоидной формы серебряного карася *Carassius auratus* (Cyprinidae). *Вопр. ихтиологии*, 40, 5, с. 581-592, 2000.
8. Головинская К.А., Ромашов Д.Д., Черфас Н.Б. Однополые и двуполые формы серебряного карася (*Carassius auratus gibelio*, Bl). *Вопр. ихтиологии*, 5, 4, с. 614-629, 1965.

9. Головинская К.А., Ромашов Д.Д., Черфас Н.Б. Однополые и двуполые формы серебряного карася (*Carassius auratus gibelio*, Bl). Вopr. ихтиологии, 5, 4, с. 614-629, 1965.
10. Горюнова А.И. О размножении серебряного карася. Вopr. ихтиологии, вып. 15, с. 106-110, 1960.
11. Домбровский В.К. О хозяйственной целесообразности совместного выращивания карпа и серебряного карася. Труды БелНИИРХ. 5, с.153-156, 1964.
12. Кирпичников В.С. Генетика и селекция рыб. Л., "Наука", 520 с., 1987.
13. Костюченко А.А. Акклиматизация рыб в водоемах Белоруссии. Труды Бел НИИРХ, 7, с.147-180, 1970.
14. Ляхнович В. Серебряный карась в прудах Белоруссии. Рыбоводство и рыболовство, 1, с.23-24, 1963.
15. Моисеев П.А., Азизова Н.А., Куранова И.И. Ихтиология, М., изд-во "Легкая и пищевая промышленность", 1981.
16. Никольский Г.В. Экология рыб. М., Высш. шк., 376 с., 1979.
17. Никольский Г.В. Экология рыб, М., "Высшая школа", 366 с., 1974.
18. Правдин И.Ф. Руководство по изучению рыб. М., "Пищевая промышленность", 376 с. 1966.
19. Рухкян Р.Г., Григорян К.А. Диплоидный гиногенез у серебряного карася (*Carassius auratus gibelio* (Bloch)) оз. Севан. Биолог. журн. Армении, 52, 2, с. 145-147, 1999.
20. Симонян А.К., Рубенян А.Р. Многолетняя динамика соотношения полов серебряного карася в бассейне оз. Севан. Биолог. журн. Армении, 63, 1, с. 10-13, 2011.
21. Чесалин В.А. К вопросу улучшения состава ихтиофауны в озерах Белорусской ССР. Научно-технический бюллетень ВНИОРХ, 1-2. с.53-55, 1956.
22. Черфас Х.Б. Естественная триплоидия у самок однополых формы серебряного карася (*Carassius auratus gibelio*, Bloch). Генетика, 2, 5, с. 16-24, 1966.
23. Чугунова Н.И. Руководство по изучению возраста и роста рыб, М., изд-во АН СССР, 1959.
24. Rauci P., Faisescu E., Banarescu P. *Carassis auratus auratus* (L.) and *Carassius auratus gibelio* (Bloch.) the representivity of two-and four complex femely, Cytology. 46, 1, p. 233-240, 1981.

Поступила 07.12.2012



• Փորձարարական և տեսական հոդվածներ • Экспериментальные и теоретические статьи •
• Experimental and theoretical articles •

Biolog. Journal of Armenia, 1 (65), 2013

THE RESEARCH ON THE ROLE OF NON UREOTELIC ARGINASES IN POLYAMINES BIOSYNTHESIS IN BRAIN AND KIDNEY *IN VITRO*

N.V. AVTANDILYAN

Yerevan State University, Department of Biochemistry
nv.avtandilyan@ysu.am

Currently the investigation of the role of arginase isoforms in biosynthesis of polyamines is an issue of key importance. The real source of ornithine for synthesis of polyamines has not been clearly defined yet. The aim of this paper is to study the influence of endogenous and exogenous polyamines on nonureotelic arginase (NUA) activity of brain and kidney *in vitro*. Analysis of Lineweaver-Burk plots show, that NUA activity of brain was inhibited by polyamines with mixed inhibition and NUA activity of kidney was decreased with uncompetitive inhibition. These results demonstrate that polyamines influence exactly on the special stereospecific (allosteric) regulatory site of the enzymes.

Nonureotelic arginase – polyamines biosynthesis – noncompetitive inhibition – stereospecific site

Արգինազի իզոֆորմների դերի պարզաբանումը պոլիամինների կենսասինթեզում հանդիսանում է արդիական հարցերից մեկը: Դեռևս որոշված չէ պոլիամինների կենսասինթեզի համար օրնիթինի իրական աղբյուրը: Տվյալ աշխատանքի նպատակն է *in vitro* պայմաններում ուսումնասիրել էնդոգեն և էկզոգեն պոլիամինների ազդեցությունը գլխուղեղի և երիկամների ոչ ուրեոթելիկ արգինազների (ՈՈԻԱ) ակտիվության վրա: Լայնուիվեր-Բերկի գրաֆիկների հետազոտությունը ցույց է տվել, որ գլխուղեղի ՈՈԻԱ-ի ակտիվության ընկճումը պոլիամինների կողմից կատարվում է խառը տիպի արգելակմամբ, իսկ երիկամների ՈՈԻԱ-ի արգելակումը՝ անմրցակցային մեխանիզմով: Այս արդյունքները վկայում են, որ պոլիամինները ազդում են Ֆերմենտի հատուկ ստերեոսպեցիֆիկ (ալլոստերիկ) կարգավորող հատվածի վրա:

Ոչ ուրեոթելիկ արգինազ – պոլիամինների կենսասինթեզ – ոչ մրցակցային արգելակում – ստերեոսպեցիֆիկ կենտրոն

Роль изоферментов аргиназы в биосинтезе полиаминов является актуальным вопросом. Еще не определен реальный источник орнитина для синтеза полиаминов. Целью работы было изучение влияния эндогенных и экзогенных полиаминов на активность неуреотелической аргиназы (НУА) головного мозга и почек *in vitro*. Анализ графиков Лайнуивера - Берга показал, что активность НУА мозга подавляется полиаминами механизмом смешанного ингибирования, а активность НУА почек подавляется бесконкурентным ингибированием. Эти результаты показывают, что ПА влияют на специальный стереоспецифический (аллостерический) регуляторный участок фермента.

Неуреотелическая аргиназа – биосинтез полиаминов – неконкурентное ингибирование – стереоспецифический участок

Arginase (EC 3.5.3.1) hydrolyses L-arginine into urea and L-ornithine, which serve as a precursor for synthesis of proline, glutamate and polyamines [6, 8, 16]. There are two distinct isoforms of arginase: namely ureotelic (UA) and nonureotelic (NUA), which have

similar enzymatic features, but different cell localization and tissue distribution [3, 4, 7]. Ureotelic arginase is widely distributed in cytosol of liver cells. It is the last enzyme of urea cycle. Comparing with ureotelic arginase nonureotelic is encoded by another gene, differs from by amino acid sequence structure (53% is the same), has mitochondrial localization and radically different pI value. It is primarily founded in kidney, prostate, brain and its role is basically different from UA, as it has nothing common with urea cycle [2, 15]. Interestingly the studies clarifying role of NUA, which demonstrates the important functions in biosynthesis of proline, glutamate, limiting function in biosynthesis of creatinine and arginine-rich histones [3, 11]. Nowadays it is assigned a task to investigate another important role of NUA. It is regulatory role in polyamines biosynthesis. Recent studies have shown that altering expression of both ureotelic and nonureotelic arginase can alter polyamines synthesis in macrophages and endothelial cells, but it is not definite yet what exact isoform has the most regulatory effect and the real source of ornithine for synthesis of polyamines [12, 13]. Polyamines (PA) which are putrescine, spermidine and spermine, are alkaline aliphatic amines, with low molecular weight, which are formed as important products throughout of the catabolism of L-arginine [14, 16]. PA electrostatically interacts with anionic macromolecules and modulates their biosynthesis, cell proliferation, differentiation and apoptosis. The aim of the presented work is to study the influence of endogenous and exogenous polyamines on activity and kinetic changes of NUA of brain and kidney in rats *in vitro*. We hypothesized, that NUA has regulatory role in the process of polyamines synthesis, while ureotelic isoform provides ornithine only for urea synthesis.

Materials and methods. *Animals and chemicals.* White male rats were maintained on normal 12-h/12-h light:dark cycles, were maintained at room temperature, and were feed a standard chow diet. The chemicals were obtained from Sigma-Aldrich Co. Ltd. (USA) and Medisar LLC (Armenia).

Preparation and thin layer chromatography (TLC) of polyamines. Tissues were extracted in 0.2M cold HClO_4 at a ratio of about 100 mg/ml HClO_4 . After extraction for 1 h in an ice bath, samples were pelleted at 15.000 g x 20 min in $+4^\circ\text{C}$, and the supernatant phase, containing the “free” polyamine fraction, neutralized by K_2CO_3 . The method of Seiler and Khan was used with some modifications as follows [9, 10]. Polyamines were chromatographed on silica gel coated plates using methanol solvent system. The spots were visualized by ninhydrin (0.2% alcoholic solution) followed by heating at 110°C for several minutes to ensure the plateau intensity of the colored complex. After TLC, the polyamine-ninhydrin bands were scraped, eluted in 2 ml ethyl acetate, and quantified in 550nm.

Purification of NUA (Gel chromatography). The method of Kossman (1966). In the column (2,5x50 cm) containing Sephadex G-100 are added the crude extracts of rat kidney and brain (10%). Enzyme extract was prepared by homogenization using 0,2 M Glycine buffer, pH 9,5. The homogenate was centrifuged at 15000g for 10 min at 4°C . The column was balanced with phosphate buffer (pH 7,2) and was collected 40 fractions each one of for 4 ml. After that in each fraction was determined arginase activity.

Arginase activity assay. The method of Van Slyke and Archibald (1946) was used with some modifications. In test-tube is added 1.5 ml glycine buffer, 0.5 ml supernatant, 0.2 ml $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.4 ml L-arginine. In sediment is determined the urea with Archibald’s method. Add in a test-tube 2.5 ml acidic mixture, 1ml supernatant, 0.25 ml 3% diacetyl monoxime and boil it in water bath in a dark 45 min. The intensity yellow color measure with spectrophotometer in 478 nm.

Statistical Analysis. Results expressed as means $\pm$ SEM. Arginase activity, polyamines effect on arginase examined by Student's t-test using Statistica software (StatSoft 7.0). The evaluation of enzyme kinetic data changing was performed with the help of Lineweaver-Burk substrate-velocity curves.

Results and Discussion. To give an answer to the mentioned hypothesis the type and the mechanism of the effect of endogenous and exogenous polyamines on NUA were determined. After decapitation of white male rats (200 ± 10 g) brain and kidney were isolated and were prepared crude extracts. In the incubation medium of NUA, purified with gel-filtration chromatography was added 0.5 and 1ml of polyamines extract from brain and kidney (endogenous polyamines). With thin layer chromatography (TLC) in tissues was determined the sum of free quantity of putrescine, spermine and spermidine (fig. 1).

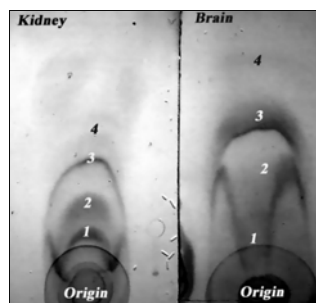


Fig.1. TLC of underivative polyamines for kidney and brain. 1 - Spermine, 2 - Spermidine, 3-Putrescine, 4 - Other polyamines. RF values for kidney and brain:
RFspm = 0.35; 0.41; RFspd = 0.52; 0.58, RFput=0.63; 0.71.

1ml PA extract from brain contain 0.98 mg mixed PA, and 1 ml PA extract from kidney contain 1.16 mg mixed PA. Beside that after gel-filtration of homogenates of brain and kidney, in the fractions of NUA was added 1ml PA20 and PA50 (1ml PA20 (PA50) mixture contain 0.4 mg putrescine (1 mg), 0,4 mg spermidine (1mg) and 0.4 mg spermine (1mg)) (exogenous polyamines). Previous experiments show that mentioned quantities of polyamines are optimal for our investigations [1]. During the fractionation of brain homogenate with Sephadex G-100, we have 2 peaks of protein quantity: high-molecular-weight, which contains only NUA, and low-molecular-weight, which doesn't contain any isoforms of arginase.

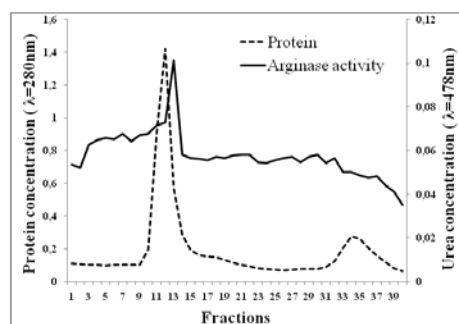


Fig. 2. Protein quantity and arginase activity in fractions of brain homogenate after gel-filtration by Sephadex G-100 (n=8, $p < 0,05$).

It was shown, that with different properties (K_m , effect of Mn^{2+} , molecular weight, intracellular localization, hormonal induction) the fraction number 14 of brain fractions is NUA fraction (fig. 2) [2, 3]. That is the reason that effect of polyamines was revealed using the mentioned fraction.

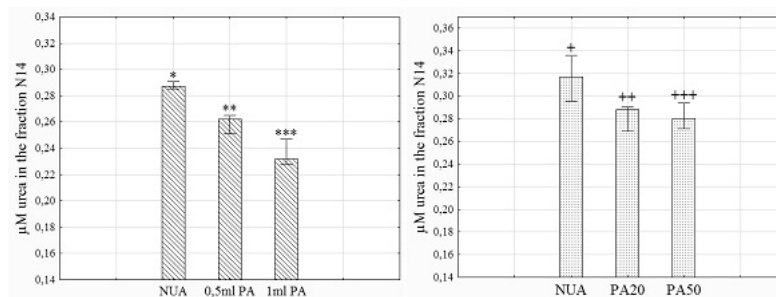


Fig. 3. The influence of endogenous (in right) and exogenous (in left) polyamines on brain nonureotelic arginase in the fraction N14 ($n=8$, $p<0,01$). NUA - nonureotelic arginase, PA - polyamines, * and + - NUA activity in fraction N14 of brain, ** - the influence of 0.5ml PA mixture on NUA, *** - the influence of 1ml PA mixture on NUA, ++ - 1ml PA20 - 20mg putrescine, spermine, spermidine in 50ml buffer (pH 9,5), +++ - 1ml PA50 - 50mg putrescine, spermine, spermidine in 50ml buffer (pH 9,5).

The polyamines final concentrations were chosen based on TLC determination of free endogenous polyamine concentrations in brain and kidney. NUA activity of brain was decreased in 10% when was added 1 ml PA20, and in 13% when was added 1 ml PA50 (fig. 3, the diagram in right) and was decreased in 10% when was added 0.5 ml PA mixture, and in 17% when was added 1 ml PA mixture (fig. 3, the diagram in left). It is logical that the results are resembled, because the quantities of endogenous and exogenous polyamins are equivalent.

To reveal the mechanism of inhibition was studied the dependence of NUA from different concentrations of the substrate (10, 50, 100, 150, 200, 250, 300 and 500 μmol L-arginine), in the presence and absence of mixed exogenous polyamines (fig. 4, 7, 8).

We have used the double-reciprocal plot for analyzing inhibition [5]. It is also called a Lineweaver-Burk plot, has the great advantage of allowing a more accurate determination of V_{max} and it is very useful in analyzing enzyme inhibition.

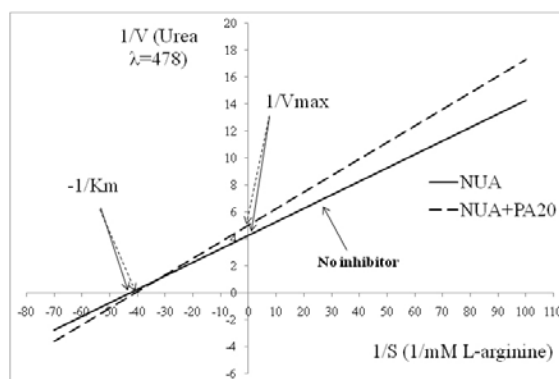
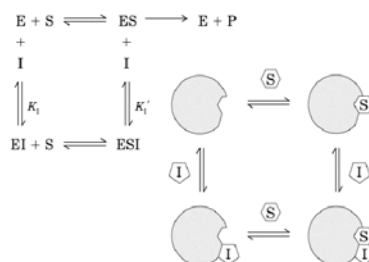


Fig. 4. Lineweaver-Burk substrate-velocity plot for nonureotelic arginase of brain ($n=7$, $p<0.05$).

The plot of Lineweaver-Burk demonstrates the mechanism of brain isoform inhibition. Polyamines affect both K_m ($K_{m\text{Arg}+\text{PA20}} = 41.1 \times 10^{-3} \text{ mM}$, $K_{m\text{Arg}} = 44.3 \times 10^{-3} \text{ mM}$) and V_{max} . The curves intersect neither in abscissa nor in ordinate. This happens in the case of mixed inhibition. This means that polyamines bind at a site distinct from the substrate active site, but it binds to either E or ES (Scheme 1).



Scheme 1. The mechanism of mixed inhibition
(E-enzyme, S-substrate, ES - enzyme-substrate complex, I-inhibitor, P-product).

After gel-filtration of kidney homogenate by Sephadex G-100 we have two peaks for protein quantity and arginase activity, which contain only NUA. For kidney assay was used the fraction N13 (high molecular) and N22 (low molecular) (fig. 5).

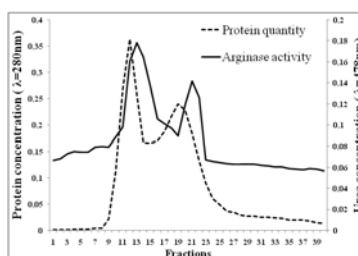


Fig. 5. Protein quantity and arginase activity in fractions of kidney homogenate after gel-filtration by Sephadex G-100 (n=8, p<0.05)

NUA activity of kidney was decreased in 9% when was added 1ml polyamines mixture of 20 mg, and in 14% when was added 1ml mixture of 50 mg PA (fig. 6, the diagram in right) and was decreased in 7% when was added 0.5 ml PA mixture, and in 11% when was added 1 ml PA mixture (fig. 6, the diagram in left).

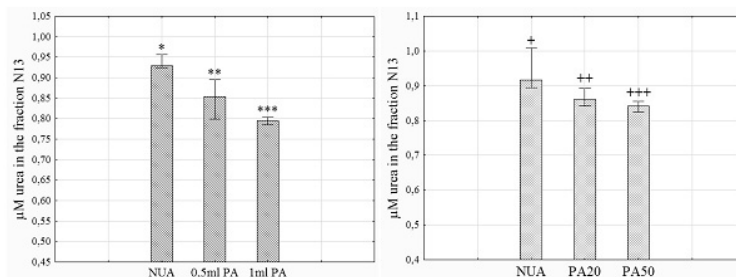


Fig. 6. The influence of endogenous (in right) and exogenous (in left) polyamines on kidney nonureotelic arginase in the fraction N13 (n=8, p<0.01). NUA - nonureotelic arginase, PA - polyamines, * and + NUA activity in fraction N13 of kidney, ** - the influence of 0.5ml PA mixture on NUA, *** - the influence of 1ml PA mixture on NUA, ++ - 1ml PA20 - 20mg putrescine, spermine, spermidine in 50ml buffer (pH 9.5), +++ - 1ml PA50 - 50mg putrescine, spermine, spermidine in 50ml buffer (pH 9.5).

Lineweaver-Burk plots for kidney NUA (fraction N13, fig. 5) are parallel to each other, what denotes to uncompetitive nature of the inhibition. PA lowers the measured Vmax.

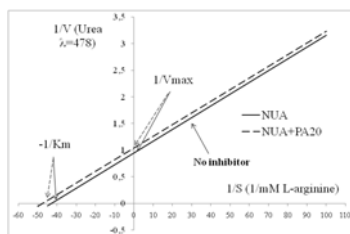
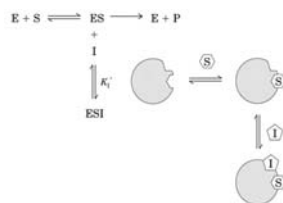


Fig. 7. Lineweaver-Burk substrate-velocity plot for nonureotelic arginase of kidney (fraction N13, $n=7$, $p<0.05$).

K_m also decreases, because the S decreases ($K_{m_{Arg+PA20}} = 45.4 \times 10^{-3}$ mM, $K_{m_{Arg}} = 48.9 \times 10^{-3}$ mM). In this case PA bind at a site distinct from the substrate active site and, unlike a mixed inhibitor, binds only to the ES complex (fig. 7 and scheme 2).



Scheme 2. The mechanism of uncompetitive inhibition

To clarify the precise mechanism of inhibition of second peak NUA(fraction #22, fig. 5) we applied two different concentrations of polyamines mixtures (fig. 8).

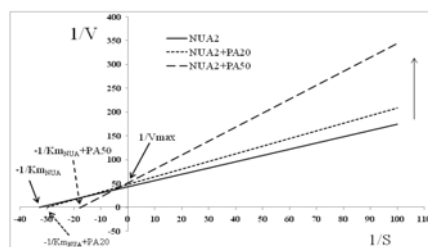


Fig. 8. Lineweaver-Burk substrate-velocity plot for nonureotelic arginase of kidney (fraction N22, $n=7$, $p<0.05$).

Polyamines affect both K_m and V_{max} ($K_{m_{Arg+PA50}} = 18.8 \times 10^{-3}$ mM, $K_{m_{Arg+PA20}} = 30.6 \times 10^{-3}$ mM, $K_{m_{Arg}} = 33.3 \times 10^{-3}$ mM). NUA of fraction N22 of kidney is inhibited by the same mechanism as brain NUA (fig. 4).

It can be seen from the results that the mechanism of inhibition of kidney high molecular fraction NUA is different from the mechanism of inhibition of brain and kidney low molecular fraction NUA. We assumed that the reason of this phenomenon could be the existence of NUA different isoforms in different tissues. However we need further profound investigations to confirm this assumption.

In the presented article we sought to reveal what effect have polyamines on NUA as a last product. Received data show that the inhibition of NUA isoforms of brain and kidney belongs to mixed and uncompetitive types of inhibition correspondingly. In the

case of brain and kidney isoforms of NUA, polyamines bind at a site distinct from the substrate active site. These results demonstrate that PA influence exactly on the special stereospecific regulatory site of enzymes. Thus the change of NUA activity can lead to quantitative changes of polyamines. It is obvious that NUA is an important source of ornithine for the biosynthesis of polyamines in kidney and brain.

Acknowledgments. Sincere gratitude to M. A. Davtyan: Head of Department of Biochemistry, Faculty of Biology, YSU, S. A. Karapetyan: associate professor, Department of Biochemistry, YSU, H. G. Javrushyan: PhD student, Department of Biochemistry, YSU.

REFERENCES

1. *Автандилян Н.А., Джаврушян А.Г.* Влияние эндогенных полиаминов на активность изоферментов аргиназы в печени крыс. *БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА: 16-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых (Пущино, 16-21 апреля 2012 года). Сборник тезисов*, ст. 162-163, 2012.
2. *Давтян М.А.* Ферменты синтеза мочевины в мозгу. Докторская диссертация, 1970.
3. *Давтян М.А.* Сисакяновские чтения (3; 2004; Армения, С40 Ереван): Труды. – Дубна: ОИЯИ, с.304, Эволюционные аспекты образования и нейтрализации аммиака, с. 106-154, 2005.
4. *Annemarie Herzfeld, Suzanne M. Raper.* The Heterogeneity of Arginases in Rat Tissues. *Biochem. J.*, 153, 469-478, 1976.
5. *David L. Nelson, Michael M. Cox.* Lehninger Principles of Biochemistry, Fourth Edition, 665-671, 2004.
6. *David E. Ash.* Structure and Function of Arginases. *J. Nutr.*, 134, 2760S–2764S, 2004.
7. *Francoise Vielle-Breitburd And Gerard Orth,* Rabbit Liver Arginase. Purification, properties, and subunit structure. *The Journal of Biological Chemistry*, 247, 4, Issue of February 25, pp. 1227-1235, 1972.
8. *Gita Venkatakrishnan, V. Shankar.* Microheterogeneity of molecular forms of arginase in mammalian tissues. *Indian Journal Of Biochemistry and Biophysics*, 40, pp. 400-408, 2003.
9. *Gopalakrishna R., Nagarajan B.* Arginase from rat fibrosarcoma. Its possible role in proline, glutamate and polyamine metabolism. *J. Biosci.*, 2, 4, pp. 275-282, 1980.
10. *Khan H.A.* TLC Determination of Aliphatic Polyamines on Calcium Sulfate Layers. *Chromatographia*, 64, 7/8, 423-427, 2006.
11. *Hector E. Flores, Arthur W. Galston.* Analysis of Polyamines in Higher Plants by High Performance Liquid Chromatography. *Plant Physiol.* 69, 701-706, 1982.
12. *Hui Li, Cynthia J. Meininger, James R. Hawker, Jr., Tony E. Haynes, Diane Kepka-Lenhart, Sanjay K. Mistry, Sidney M. Morris, Jr. And Guoyao Wu.* Regulatory role of arginase I and II in nitric oxide, polyamine, and proline synthesis in endothelial cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 280, E75–E82, 2001.
13. *Hui Li, Cynthia J. Meininger, James R. Hawker, Jr., Tony E. Haynes, Diane Kepka-Lenhart, Sanjay K. Mistry, Sidney M. Morris, Jr. And Guoyao Wu.* Activities of arginase I and II are limiting for endothelial cell proliferation. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol.*, 282, R64–R69, 2002.
14. *Joshua L. Deignan, Justin C. Livesay, Lisa M. Shantz, Anthony E. Pegg, William, E. O'Brien, Ramaswamy K. Iyer, Stephen D. Cederbaum and Wayne W. Grody.* Polyamine homeostasis in arginase knockout mice. *Am J Physiol Cell Physiol*, 293, 1296-1301, 2007.
15. *Pekka Kilpeläinen.* Ornithine Decarboxylase. Expression and regulation in rat brain and in transgenic mice. Doctoral Dissertation. 2002.
16. *Philipp S. Lange, Brett Langley, Peiyuan Lu, Rajiv R. Ratan.* Novel Roles for Arginase in Cell Survival, Regeneration, and Translation in the Central Nervous System. *J. Nutr.* 134, 2812S–2817S, 2004.
17. *Sidney M. Morris Jr.* Enzymes of Arginine Metabolism. *J. Nutr.* 134, 2743S–2747S, 2004.

Received 08.11.2012



Биолог. журн. Армении, 1 (65), 2013

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЙ ПРОИЗРАСТАНИЯ И БИОМЕТРИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ДИКОРАСТУЩЕГО ЭСПАРЦЕТА (*ONOBRYCHIS* MILL.) В АРМЕНИИ

М.А. НАВАСАРДЯН

Центр эколого-ноосферных исследований НАН РА
marine_navasardyan@yahoo.com

Обобщена часть 4-летних исследований, посвященных уточнению местообитаний, изучению экологических условий и некоторых биометрических показателей дикорастущих эспарцетов, произрастающих в природных ландшафтах Армении. На базе этих данных создана ГИС-картосхема распространения 12 видов, которые встречаются в 6 марзах республики. Установлен широкий спектр распространения растений по вертикальной поясности горных экосистем (от 740 до 2400 м над ур.м.), выявлено существенное различие в показателях надземной биомассы и соотношения лист/стебель отдельных видов.

Дикорастущий эспарцет – среда обитания – ГИС-картосхема – биометр

Ամփոփված է քառամյա հետազոտությունների մի մասը՝ նվիրված Հայաստանի բնական լանդշաֆտներում աճող վայրի կորնգանի բնակատեղերի հստակեցմանը, էկոլոգիական պայմանների ու որոշ կենսաչափական ցուցանիշների ուսումնասիրմանը: Այս տվյալների հենքի վրա ստեղծվել է հանրապետության 6 մարզերում հանդիպող 12 տեսակների տարածման ԵՏՀ-սխեմատիկ քարտեզ: Բացահայտվել է բույսերի տարածման լայն սպեկտր՝ ըստ լեռնային էկոհամակարգերի ուղղաձիգ գոտիականության (ծ.մ. 740-ից մինչև 2400 մ բարձրության վրա) և վեր է հանվել էական տարբերություն՝ առանձին տեսակների վերգետնյա զանգվածի ու տերև/ցողուն հարաբերության ցուցանիշներում:

Վայրի աճող կորնգան – բնական միջավայր – ԵՏՀ-քարտեզ սխեմա – կենսաչափագրում

A part of 4-year investigations devoted to the definition of habitats, characterization of ecological conditions and some biometric indices of wild sainfoin grown in the natural landscapes of Armenia is summarized in this study. On the basis of these data a GIS-schematic map on the distribution of 12 sainfoin's species happened in 6 marzes of Republic of Armenia was shown. A wide range spectrum of plants' distribution according to vertical belts of mountain ecosystems (from 740 to 2400 m a.s.l.) and was revealed a significant difference in the indices of aboveground biomass and leaf/stem ratio of different species.

Wild-growing sainfoin – habitat – GIS-schematic map – biometrics

Флора Армении отличается большим разнообразием сосудистых растений (около 3600 видов, из коих 103 эндемиков), что в основном связано с ее расположением в месте соприкосновения двух различных флористических провинций – кавказской (мезофильной) и армено-иранской (ксерофильной) [11]. В горных экосистемах страны в составе семейства *Fabaceae* широкое распространение имеют

представители рода *Onobrychis* Mill. [4, 12], которые встречаются на различных высотных отметках – от полупустынного до субальпийского поясов. В целом род *Onobrychis* насчитывает около 130 видов, из коих на Кавказе, согласно данным Гроссгейма [4], произрастает 37, а Меницкого – 23 вида [9]. Тамамшян [12] во “Флоре Армении” описала 20 видов эспарцета, а Аревшатын считает, что их всего 17 [1, 2]. Отметим, что род эспарцета в Армении представлен четырьмя секциями (*Onobrychis* Mill., *Hymenobrychis* DC., *Heliobrychis bungi* и *Dendrobrychis* DC.), которые различаются по габитусу и опушенности растений, форме и размеру бобов, окраске венчиков и др.

Эспарцет в Закавказье был введен в культуру более 1000 лет назад, предшественниками являлись дикие формы *O. transcaucasica* Grossh. и *O. altissima* Grossh. [5]. Следует отметить, что эспарцет повсеместно возделывался до 50-х годов, затем по мере введения в культуру многоукосной люцерны его посевная площадь резко сократилась. Хотя он по урожайности значительно уступает люцерне, однако имеет высокое кормовое значение: включение эспарцета в кормовой рацион благотворно влияет на переваримость сырого протеина в рубце жвачных, повышает сопротивляемость организма к различным заболеваниям (глистным, кокцидиозным), предотвращает вздутие живота и др. Эти качества эспарцета все чаще привлекают внимание ученых развитых стран, особенно в связи с переходом к органическому сельскому хозяйству.

В настоящей работе обобщены некоторые результаты исследований по установлению точных координат местообитаний, характеристике экологических условий произрастания и определению биометрических показателей 12 дикорастущих видов эспарцета, распространенных в 6 марзах Армении.

Материал и методика. Исследования проводились в горных экосистемах Вайоцдзорского, Гегаркуникского, Котайкского, Лорийского, Тавушского и Сюникского марзов. Объектом исследований служили *O. altissima* Grossh., *O. atropatana* Boiss., *O. bungei* Boiss., *O. cyri* Grossh., *O. hajastana* Grossh., *O. meschetica* Grossh., *O. michauxii* DC. *O. oxytropoides* Bungei ex Boiss., *O. petrea* (M. Bieb. ex Willd) Fisch., *O. radiata* (Desf.) M. Bieb., *O. takhtajanii* Sytin и *O. transcaucasica* Grossh., собранные из 34 пунктов указанных марзов (рис. 1).

Следует отметить, что определение дикорастущих видов эспарцета проводилось известным систематиком бобовых растений И.Г. Аревшатын, которая участвовала во всех полевых экспедиционных работах. Определение географических координат местообитаний видов проводилось с помощью портативного прибора GPS-MA59802 (MeridianGold, Magellan). Для создания ГИС-картосхемы была оцифрована топографическая карта и ее отдельные объекты (пункты пробоотбора, административные границы, дороги, речные потоки, горные вершины и т. д.), затем для каждого из них составлена соответствующая база данных. Координаты местообитаний вводились в программу ArcGIS-9.1, и с помощью SpatialAnalyst проводился пространственный анализ распределения видов [6].

Отбор растительных образцов на каждом участке проводился случайным (Random) методом, в 10 – 20-кратной повторности. Этот подход был применен исходя из нашей предварительной оценки ассоциаций эспарцета, где в пределах одного и того же небольшого участка наблюдалось существенное различие в габитусе растений, их ветвистости, облиственности и т.д. В лаборатории растительный материал был разделен на листья, стебли и цветы, которые затем высушивались в отдельности до воздушно-сухого веса и взвешивались. Полученные данные подвергались статистической обработке (Descriptivestatistics) с использованием компьютерного пакета StatisticsforWindows, 1998, Release 6,0A, StatSoftInc., USA.

Результаты и обсуждение. На рис.1 представлена ГИС-картосхема распространения 12 видов дикорастущего эспарцета в 6 марзах Армении. Как видно из рис.1, исследуемые виды по природным ландшафтам распределялись различным образом, при этом максимальное их число было обнаружено в Вайоцдзорском марзе –

O. altissima, *O. bungei*, *O. michauxii*, *O. petrea* и *O. takhtajanii* (на карте обозначены соответствующими числами: 1,3,7,9,11); в Котайкском 4 вида – *O. altissima*, *O. atropatana*, *O. hajastana* и *O. michauxii* (1,2,5,7); в Гегаркуникском и Сюникском марзах по 3, соответственно – *O. altissima*, *O. bungei*, *O. transcaucasica* (1,3,12) и *O. altissima*, *O. meschetica* и *O. radiata* (1,6,10) и в Лорийском и Тавушском по 2 – *O. oxutropoides*, *O. radiata* (8,10) и *O. cyri*, *O. radiata* (4,10).



Рис. 1. ГИС-картосхема распространения 12 видов дикорастущего эспарцета в Армении

Как было сказано в методической части работы, точные координаты и другие геоморфологические особенности местообитаний дикорастущих видов эспарцета сохранены в базе данных картосхемы, а в табл. 1 приведены лишь названия пунктов и типов почв, где непосредственно был собран материал, обобщенный в нашей работе. Приведенные данные показывают, что дикорастущие виды эспарцета встречаются в пределах вертикальных поясов от горно-лесного (740 м, *O. cyri*) до субальпийского (2400 м, *O. altissima*), при этом они в основном растут на горно-каштановых почвах и горных черноземах, а *O. cyri* предпочитает коричневые лесные и дерново-карбонатные лесные почвы [9]. Можно заметить, что наиболее высокую адаптационную способность имели следующие 5 видов – *O. transcaucasica*, *O. altissima*, *O. radiata*, *O. michauxii*, *O. bungei*, учитывая, что в перечисленных пунктах их произрастания количество осадков колеблется в пределах от 350 до 700 мм/год, среднемесячное максимальное значение температуры (июль) 18–24°C, минимальное (январь) – – 4°C – –14°C, pH почвенного раствора – 6,5–8,5, а содержание гумуса – 5–15%. Помимо этого, по нашим наблюдениям, указанные виды благополучно растут на склонах различной экспозиции и крутизны, на подтипах почв с различным механическим составом. Это, очевидно, связано с тем, что эспарцет уже в первый год вегетации формирует мощную корневую систему, способную проникать в глубокие слои почв и обеспечивать надземные органы влагой и питательными веществами [2].

Табл. 1. Некоторые характерные особенности местообитаний дикорастущих видов эспарцета

Вид	Высота, м над ур. м.	Пункт/регион пробоотбора	Типы почв
<i>O. altissima</i>	2100-2300	Селимский перевал	Горные черноземы
	1950	Лчашен/Севан	– “ – “ –
	2400	Геговит/Мартуни	Лугово-черноземные
	1390	Шамб/Сисиан	Горные каштановые
	1385	Гарни	– “ – “ –
<i>O. atropatana</i>	1640-1690	Джрвеж	Горные каштановые
<i>O. bungei</i>	2040-2090	Лчашен/Севан	Горные черноземы
	1980	Сараван/Сисиан	– “ – “ –
	1720	Агаракадзор-Гнишик	Горные каштановые
<i>O. cyri</i>	740-810	Енокаван/ Иджеван	Горные бурые лесные
	1700	Баганис/Ноемберян	Горные дерново-карбонатные лесные
<i>O. hajastana</i>	1500-1640	Джрвеж	Горные каштановые
<i>O. meschetica</i>	1390	Шамб/Сисиан	Горные каштановые
<i>O. michauxii</i>	1640	Джрвеж	Горные каштановые
	1380	Гарни	– “ – “ –
	1500	Сараван/Сисиан	Горные черноземы
<i>O. oxytropoides</i>	1970	Ташир	Горные черноземы
	2020	Благодарное/Ташир	Лугово-черноземные
<i>O. petrea</i>	1720	Агаракадзор-Гнишик	Горные каштановые
<i>O. radiata</i>	900	Тегут/Дилижан	Коричневые лесные
	750	Воскепар/Ноемберян	– “ – “ –
	1740	Агиту/Сисиан	Горные черноземы
	1470	Лернапат/Ванадзор	Горные каштановые
<i>O. takhtajanii</i>	1720	Агаракадзор-Гнишик	Горные каштановые
<i>O. transcaucasica</i>	2230	Геговит/Мартуни	Горные черноземы
	1940	Лчашен/Севан	– “ – “ –

В табл. 2 обобщены результаты определений биометрических показателей исследуемых видов эспарцета, собранных по вышеуказанной методике. Отметим, что впервые аналогичные исследования на 9 видах эспарцета были проведены профессором Матевосяном [7], однако, в отличие от наших опытов, проведенных на местах их произрастания, ученый проводил измерения на Ереванском опытном участке Сельскохозяйственного института. Из приведенных данных видно, что исследуемые растения существенно различались по высоте, варьирующей в пределах 21-80 см, при этом самым низкорослым (21 см) был вид *O. oxytropoides*, а высокорослыми – *O. altissima*, *O. bungei*, *O. radiata*, *O. transcaucasica*, *O. meschetica* и *O. takhtajanii* (67-80 см). Статистический анализ экспериментального материала показал, что в пределах каждого исследуемого вида стандартная ошибка не превышала 10% величины средней выборочной, при этом минимальные показатели получены для *O. bungei*, *O. transcaucasica* и *O. altissima*, а максимальные – *O. michauxii* и *O. oxytropoides*. Коэффициент вариации также менялся незначительно (1.3-2.0).

Табл. 2. Биометрические показатели некоторых видов рода *Onobrychis* Mill

Вид	Высота, см		Биомасса, г/раст.		Соотношение лист/стебель
	среднее	Диапазон колебаний*	среднее	Диапазон колебаний*	
<i>O. altissima</i>	80±2.2	<u>72-105</u> 1.5	20.5±2.7	<u>10-31</u> 3.1	0.7
<i>O. atropatana</i>	39±2.2	<u>28-50</u> 1.8	7.8±0.7	<u>4-10</u> 2.6	2.2
<i>O. bungei</i>	75±1.6	<u>65-84</u> 1.3	14.4±1.1	<u>8-22</u> 2.7	0.7
<i>O. cyri</i>	62±2.5	<u>48-75</u> 1.6	3.1±0.5	<u>1-5.3</u> 4.8	0.6
<i>O. hajastana</i>	44±3.0	<u>33-60</u> 1.8	4.9±1.2	<u>2-12</u> 5.8	0.5
<i>O. meschetica</i>	68±2.9	<u>55-80</u> 1.8	16.8±2.9	<u>8-29</u> 3.5	0.5
<i>O. michauxii</i>	41±3.4	<u>30-60</u> 2.0	4.8±1.2	<u>2-12</u> 6.1	1.8
<i>O. oxytropoides</i>	21±1.7	<u>15-30</u> 2.0	1.4±0.4	<u>0.3-3.4</u> 11.3	-
<i>O. petrea</i>	38±1.9	<u>28-50</u> 1.8	10.3±1.6	<u>4.8-21</u> 4.3	0.9
<i>O. radiata</i>	75±1.8	<u>70-90</u> 1.3	13.9±1.3	<u>6.3-22</u> 3.5	0.6
<i>O. takhtajanii</i>	67±2.2	<u>57-79</u> 1.4	16.8±3.1	<u>6.4-36</u> 5.7	0.4
<i>O. transcaucasica</i>	69±2.1	<u>62-80</u> 1.3	19.5±2.6	<u>10-31</u> 3.1	0.5

*в числителе минимальные и максимальные показатели, в знаменателе – коэффициент вариации, т.е. отношение максимального показателя к минимальному.

Из данных табл. 2 также видно, что, в отличие от высоты, надземная биомасса у исследуемых видов колебалась в очень широких пределах (1.4-20.5 г/растение), с минимальным показателем, обнаруженным у *O. oxytropoides* (почти вся биомасса у этого вида приходится на листья) и максимальным – *O. altissima* и *O. transcaucasica* (19.5-20.5 г/растение), которым несколько уступали виды *O. takhtajanii* и *O. meschetica* (по 16,8 г/раст). Как и ожидалось, были получены высокие показатели стандартной ошибки (до 29%) и коэффициента вариации (до 11.3): по обоим статистическим параметрам отличался *O. oxytropoides*, а *O. bungei*, наоборот, имел минимальные показатели. Очевидно, это объясняется тем, что в природных ассоциациях эспарцета встречаются растения разного возраста (одного года, двух лет и т.д.), которые существенно различаются по массе.

Известно, что листья и стебли эспарцета различаются по содержанию питательных веществ [8] и кормовое значение биомассы главным образом определяется количественным соотношением этих двух частей растений. Из данных табл. 2 видно, что наименьшее значение соотношения лист/стебель было у *O. takhtajanii* (0.4), а высокое – *O. michauxii* и *O. atropatana* (1.8 и 2.2), что, очевидно, можно объяснить способностью этих видов сохранять до начала плодообразования нижние листья, развивающиеся непосредственно из узла кущения. Соотношение лист/стебель остальных видов мало отличалось друг от друга (0.5-0.7).

Таким образом, в результате 4-летних полевых экспедиционных исследований, проведенных в 6 марзах республики, были уточнены местообитания и точные координаты 12 видов дикорастущего эспарцета и создана ГИС-картосхема их рас-

пространения. Выявлен широкий диапазон распределения растений по вертикальной поясности горных ландшафтов (от 740 до 2400 м над ур.м.), свидетельствующий об их высокой адаптационной способности. Показано, что в горных ландшафтах Армении наибольшую распространенность имеют виды – *O. transcaucassica*, *O. altissima*, *O. radiata*, *O. michauxii*, *O. bungei*, которые успешно произрастают на почвах коричневых лесных, горных каштановых и горных черноземах. Выявлено существенное различие в биометрических показателях дикорастущих эспарцетов, особенно по биомассе и соотношению лист/стебель.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аревшатын И.Г. Новые виды Fabaceae для флоры Кавказа и Армении. Флора, растительность, растительные ресурсы Армении, 16, с. 92-93, 2007.
2. Аревшатын И.Г. Род *Opobrychis* (Fabaceae) в Южном Закавказье. Флора, растительность, растительные ресурсы Армении, 17, с. 23-27, 2009.
3. Гладкий М.Ф., Корнилов А.А., Яценко Я.Л. Эспарцет. М., Колос, 128 с., 1971.
4. Гроссгейм А.А. Определитель растений Кавказа. М., изд-во Советская наука, 747 с., 1949.
5. Кормовые растения сенокосов и пастбищ СССР. Под ред. И.В.Ларина и др., М. Л., 2, 948 с., 1951.
6. Курбатова А.С., Маршев С.В. Использование ГИС в целях оценки экологической ситуации и экологического проектирования. Информ. бюлл. ГИС-Ассоциация, 35 с., 1996.
7. Матевосян А.А. Дикie эспарцеты южной части Арм.ССР и пути их использования. Арм. филиал АН СССР, Бот.общество, Сб. научных трудов, вып. 4, с. 3-6, 1940.
8. Матевосян А.А. Эспарцеты Армении. Ереван. Изд-во Академии Наук АрмССР, 238 с. 1950,
9. Меницкий Ю.Л. Конспект кавказских видов *Opobrychis* (Fabaceae). Бот.журнал, 86, 10, с. 75-88, 2001,
10. Почвы Армянской ССР. /Под ред. Р.А. Эдиляна и др. Ереван. Изд-во Айастан, 384 с., 1976.
11. Файвуш Г.М. Эндемичные растения флоры Армении. Флора, растительность, растительные ресурсы Армении, 16, с. 62-68, 2007.
12. Флора Армении. Под ред. А.Л. Тахтаджяна. Ереван. Изд-во АН Арм. ССР, 4, 434 с., 1962.

Поступила 03.08.2012



Biol. Journal of Armenia, 1 (65), 2013

THE ECOLOGICAL ASSESSMENT OF SOILS AROUND AGARAK TOWN

K.A. GHAZARYAN¹, H.S. MOVSESYAN¹,
N.P. GHAZARYAN², K.V. GRIGORYAN¹

¹Yerevan State University, Faculty of Biology, Department of Ecology and
Nature Protection, ghazaryank@mail.ru

²Ministry of Agriculture, Scientific Center for Risks Assessment and Analysis
in Food Safety Area SNCO, Nubarashen

Mining and smelting industry is developed in the area of the study. This economic sphere is one of the main sources of soil pollution with heavy metals which are considered as dangerous pollutants causing the desertification of soils. As a result of this study the appreciable qualitative changes in contents of some heavy metals were revealed.

Soil pollution – heavy metals – mining industry – recultivation of soils – hydroseeding method

Ուսումնասիրման տարածքում զարգացած են արդյունաբերության լեռնամետալուրգիական և լեռնարդյունաբերական ճյուղերը: Արդյունաբերության այս ճյուղերը հանդիսանում են հողերի անապատացման պրոցեսին նպաստող վտանգավոր աղտոտիչներից՝ ծանր մետաղներով, աղտոտման հիմնական աղբյուրներից մեկը: Մեր կողմից կատարված ուսումնասիրություններով հայտնաբերվել են մի շարք ծանր մետաղների պարունակության նկատելի քանակական փոփոխություններ:

*Հողերի աղտոտում – ծանր մետաղներ – լեռնարդյունաբերություն –
հողերի ռեկուլտիվացում – հեղուկ սերմնացանի մեթոդ*

В районе проводимых нами исследований (г.Агарак) развиты горнодобывающая и горнометаллургическая отрасли промышленности. Эти отрасли являются одним из основных источников загрязнения почв тяжелыми металлами – наиболее опасными загрязнителями, способствующими процессу опустынивания почв. Проведенными нами исследованиями выявлены заметные количественные изменения в содержании ряда тяжелых металлов.

*Загрязнение почв – тяжелые металлы – горнодобывающая промышленность – рекультивация
почв – метод гидропосева*

Agarak town is situated in the south-east of Armenia. Mining and smelting industry is developed in this area. This economic sphere is one of the main sources of soil pollution with heavy metals (Pb, Cu, Ni, Cd, As, Mo, etc) which are considered as dangerous pollutants causing the desertification of soils [4, 5, 7, 8, 9, 10].

The lands of the studying area belong to the mountain forest brown soil type. In Armenia, this soil type is distributed at 500-1700 meters above sea level, and reaches up to 2400 meters in arid southern slopes. The topology of mountains with forest brown soils is characterized by various altitudes, such as mountains and dividing ridges, as well as fallings lowering to clefts and tributaries [1, 3].

Materials and methods. Experiments were carried out under field and laboratory conditions. Ten the most risky regions and one non-polluted region, as a control, were selected for field studies the sections were dug, and the samples were taken from the horizontal profile. The physicochemical parameters of soil samples were determined under laboratory conditions [2, 6].

Results and Discussion. Eleven sections were sorted into types and subtypes according to the results of field study.

The main soil types in studying objects were the mountain forest brown soil type and its 2 subtypes: (1) the brown carbonate soil of mountain forests, and (2) the brown typical soil of mountain forests.

Section descriptions and total properties determined during the field study are presented in tab. 1.

Tab. 1. Total characteristics of sampling areas

Sample number	Soil type and subtype	Basin	Surface gradient	Microrelief	Soil surface cover	Erosion degree (0-4)
1	brown typical of forest	Karchevan river	30°	smooth	herbage - 75%, naked soil - 20%, stones - 5%	2
2	brown typical of forest	Karchevan river	25°	smooth	herbage - 40%, naked soil - 30%, stones - 30%	2
3	brown typical of forest	Karchevan river	30°	small mounds	herbage - 40%, naked soil - 20%, stones - 40%	2
4	brown typical of forest	Karchevan river	35°	smooth	herbage - 70%, shrubs - 15%, naked soil - 10%, stones - 5%	2
5	brown typical of forest	Karchevan river	0°	smooth	herbage - 85%, shrubs - 12%, stones - 3%	0
6	brown carbonate of forest	Karchevan river	30°	mounds	herbage - 50%, naked soil - 10%, stones - 40%	2
7	brown carbonate of forest	Karchevan river	0°	smooth	herbage - 50%, naked soil - 50%	0
8	brown carbonate of forest	Karchevan river	10°	small mounds	herbage - 30%, naked soil - 20%, stones - 50%	2
9	brown carbonate of forest	Araks river	5°	small mounds	herbage - 20%, naked soil - 25%, stones - 55%	3
10	brown carbonate of forest	Araks river	10°	smooth	herbage - 30%, naked soil - 45%, stones - 25%	2
Control	brown carbonate of forest	Karchevan river	0°	smooth	herbage - 70%, naked soil - 25%, stones - 5%	1

According to tab. 1, the soil surface was 10-30% uncovered by plants, except the section 5, which was fully covered, and the sections 7 and 10, which were nearly half covered. The main vegetation was presented by herbage. Shrubs were observed only in the areas of sections 4 and 5. The studied soils were medium and highly eroded, except the 5, 7 and control sections, where erosion processes almost didn't occur related to the well-developed vegetation and the smooth microrelief.

The type and subtype properties of the soil are presented in the paragraphs bellow.

The first subtype was the brown carbonate soil of mountain forests (sections – 6, 7, 8, 9, 10 and control). This subtype of soil was distributed 700-1000 meters above sea level, on the gradients of 0-30 degrees, the microrelief was mainly smooth, and the erosion degree was 0-3. This soil was mainly very rocky, and the carbonates were distributed from top to bottom. This subtype of soil was not fertile and useful for agricultural purposes, except the 7 and control samples.

The second subtype of the studied soil was the brown typical soil of mountain forests (sections – 1, 2, 3, 4, 5). The brown typical soil of mountain forests occupied intermediate place between the carbonate and limeless subtypes by their geographical position, morphological and physicochemical characteristics. This type of soil, compared to the carbonate type, had higher position above sea level, the gradient was 0-35 degrees, the microrelief was smooth, and the erosion degree was 0-2. The soil of this subtype was not fertile and useful for agricultural purposes, except the samples 4 and 5.

Data indicate that the soils of all areas were medium eroded, except the 5, 7 and control samples (tab. 1). The erosion processes were conditioned by natural climatic conditions, high slope gradients and high anthropogenic impact. Due to high anthropogenic pressure, related to economic activities and soil pollution (especially with heavy metals), the growth of vegetation and the formation of strong root system were partially pressed, and the soil became more vulnerable to erosion processes. General characteristic of studied soil is presented in tab. 2.

The best ratio of physical clay/physical sand was observed in soil samples 2, 4, 5, 7. These soil samples, according to texture classification, were characterized as good soil. The worst ratio of physical clay/physical sand was observed in soil samples 8, 9, 10, which were characterized as moderate bad soil according to the texture classification. Much rockiness was observed in soil samples 6, 8, 9. Comparatively well-developed root systems were observed in 4, 5 and control soil samples. The 2, 4, 5, 7 and control soil samples had favorable structural properties. The pH of studying soil samples was slightly alkaline and ranged from 7.43 to 7.75. The content of humus ranged from 1.73 to 4.52% in the upper A horizon. The highest content of humus was observed in section 5 (4.52%), where the soil was not eroded and was rich with vegetation. The lowest content of humus was observed in section 9, where incompletely formed, sandy loam, highly eroded, slight capacity soil types were distributed.

The content (mg/kg) of some metals (including heavy metals) and non-metals in studied soils is presented in tab. 3. As the content of metals and nonmetals in soil is specific and depends on the compound of rocks producing the soil, and the conditions of soil formation, for the determination of pollution level the obtained results were compared with control sample which was considered as a background. The study revealed significant changes in concentrations of following heavy metals: Mn (samples 4, 6 and 7), Co (1, 4), Ni (4, 8, 9), V (2, 4), Zn (6), Cr (8, 9), As (2, 3, 6, 7, 9), Cu, Mo, Ag, Cd, Pb (almost all samples). Compared to the control sample a significant difference (over 15 times) in the content of heavy metals such as copper and molybdenum was observed which was due to the high content of copper and molybdenum in ores. Soil samples 2, 3, 4, 6 and 9 were highly polluted, and the soil sample 10 was non-polluted. It is important to mention that such pollution of soil with heavy metals in studied area was conditioned by human activities, especially by mining and smelting industrial activities.

Tab. 2. General characteristics of studied soils

Sample number	Mechanical consistency		Texture	Texture classification	Stones	Quantity of roots	Structure	pH	Humus content, %
	Physical clay < 0.01, %	Physical sand >0.01, %							
1	30	70	sandy clay loam	moderate bad	basically 2-5 mm	few	granular weak 1-2 mm	7.53	2.87
2	40	60	silty clay loam	good	basically 2-5 mm	few	granular mild 1-2 mm - 20%, 2-5 mm - 60%, > 5 mm - 20%	7.75	1.83
3	20	80	sandy loam	moderate bad	2-5 mm - 60%, 5-20 mm - 40%	very few	granular weak 1-2 mm	7.68	2.14
4	40	60	silty clay loam	good	basically 2-5 mm	moderate	granular mild 1-2 mm - 70%, 2-5 mm - 30%	7.59	3.12
5	40	60	silty clay loam	good	basically 2-5 mm	many	granular mild 1-2 mm - 20%, 2-5 mm - 70%, > 5 mm - 10%	7.43	4.52
6	25	75	sandy clay loam	moderate bad	2-5 mm - 35%, 5-20 mm - 40%, > 20 mm - 25%	few	granular weak 1-2 mm	7.62	2.42
7	40	60	silty clay loam	good	basically 2-5 mm	few	granular mild 1-2 mm - 60%, 2-5 mm - 40%	7.48	3.34
8	15	85	sandy loam	moderate bad	2-5 mm - 30%, 5-20 mm - 40%, > 20 mm - 30%	very few	dusty up to 1mm	7.74	1.85
9	13	87	sandy loam	moderate bad	2-5 mm - 15%, 5-20 mm - 50%, > 20 mm - 35%	very few	dusty up to 1mm	7.75	1.73
10	10	90	sandy loam	moderate bad	2-5 mm - 50%, 5-20 mm - 40%, > 20 mm - 10%	very few	granular weak 1-2 mm	7.69	1.90
Control	30	70	silty clay loam	medium	2-5 mm - 70%, 5-20 mm - 30%		granular mild 1-2 mm - 50% 2-5 mm - 50%	7.45	3.59

Tab. 3. The content (mg/kg) of some metals (including heavy metals) in studied soils

Sample number	V	Cr	Fe	Mn	Co	Ni	Cu	Zn	As	Mo	Pb	Cd
1	12.5	1.4	2841.5	54.3	2.1	1.3	53.3	4.9	0.6	5.2	1.1	0.03
2	16.3	0.6	3672.0	61.5	1.6	2.3	145.5	10.4	1.5	13.2	2.3	0.06
3	11.9	0.7	3242.0	32.3	1.3	0.7	123.5	7.1	1.0	8.5	3.9	0.04
4	14.1	3.8	3747.8	99.9	2.1	4.1	23.4	11.7	0.8	1.2	1.5	0.05
5	7.5	2.7	2299.7	70.0	1.3	2.2	25.3	7.7	0.4	1.5	1.7	0.03
6	11.2	2.0	3043.4	184.5	1.6	1.7	56.2	19.2	1.6	4.2	6.4	0.22
7	8.9	1.3	2974.3	113.0	1.4	1.0	81.2	10.8	1.0	6.2	3.5	0.04
8	9.5	6.8	2576.2	50.9	1.6	4.1	35.4	6.6	0.8	1.2	1.2	0.04
9	9.2	6.0	2592.9	49.0	1.4	3.7	39.7	6.5	0.9	0.9	1.4	0.05
10	8.2	2.8	2256.7	39.2	1.2	1.7	17.4	4.4	0.7	0.6	0.6	0.01
Control	7.5	2.6	2250.4	56.4	1.3	2.0	9.5	8.0	0.6	0.5	0.8	0.02

Taking into consideration all above-mentioned it is necessary to implement reclamation activities in the areas around Agarak town as the source of eroded, heavy metal polluted soils. The reclamation works are advisable to implement by the method of hydroseeding which is considered as a subtype of biological reclamation. The main goal of biological reclamation is the recovery of soil formation natural process, the sti-

mulation of soil self-purification properties and biocenosis self-recovery process. A biological recultivation results in formation of a landscape with satisfactory biodiversity on disturbed and polluted areas.

It is also desirable to add some plant hormones and microorganisms to specific mixture used during the implementation of hydroseeding method for the increasing of germination ability of seeds, as well as for the shortening of disease incidence and the acceleration of the growth of plants. In 2-3 hours after the sowing of hydroseeding mixture the mulch material forms a specific cover on the soil which provides satisfactory humidity for the soil as well as prevents the erosion of the soil and the movement of seeds by wind and water. After the growing of plants, the mulch material fibers are decomposed enriching the soil by organic matters.

As the area of our studies was polluted especially with heavy metals it is also desirable to add to seed mixture used in hydroseeding method the seeds of plants which have ability to remove selectively from the soil some heavy metals making the process of recultivation more effective.

It is also suggested to use meliorants especially the mixture of organic fertilizers (manure, biohumus) and natural meliorants for utilization of heavy metals or at least for reducing of their toxic impact on the environment. It is proved scientifically that it is possible to improve the condition of soils polluted with heavy metals and to decrease the content of mobile forms of these elements by joint use of natural meliorants and organic fertilizers.

REFERENCES

1. Հայկական ՍՍՀ ֆիզիկական աշխարհագրություն: ՀՍՍՀ ԳԱ, 471 էջ, 1971:
2. *Аринушина Е.В.* Руководство по химическому анализу почв. Изд. Московского университета., 492 с., 1962.
3. Атлас почв Республики Армения. Ереван, 70 с., 1990.
4. Environmental assessment of soil for monitoring. I, Indicators and Criteria. European Communities, 2009.
5. European Commission. Communication of 16 April 2002 from the Commission to the Council, the European Parliament, the Economic and Social Committee and the Committee of the Regions: Towards a Thematic Strategy for Soil Protection. COM, p. 179, 2002.
6. *Friedlová M.* The Influence of heavy metals on soil biological and chemical properties. Soil & Water Res., 1, 5, p. 21–27, 2010.
7. *Ghazaryan K., Gevorgyan G., Grigoryan K.* Evaluation of pollution level of soils of ecological vulnerable areas around Agarak town and suggestion of improvement ways. 4th International Congress “EUROSOIL 2012 – Soil Science for the Benefit of Mankind and Environment”, Bari, Italy, p. 2351, 2012.
8. ISO/DIS 19258. Soil quality – Guidance on the determination of background values, 2004.
9. *Mikanova O.* Effects of heavy metals on some soil biological parameters. Journal of Geochemical Exploration, 88, p. 220–223, 2006.
10. *Ross S.M.* Toxic metals in soil–plant systems. Wiley, Chichester, 1994.

Received 16.10.2012



Биолог. журн. Армении, 1 (65), 2013

ПОЛУЧЕНИЕ ХОЛОДОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ЗАКВАСОК ПРОБИОТИКА “НАРИНЕ”

Г.Г. ОГАНЕСЯН, А.А. БАРСЕГЯН, С.С. ОГАНЕСЯН,
А.В. МАРУТЯН, Г.Г. ГРИГОРЯН

НПЦ “Армбиотехнология” НАН РА
hhov@sci.am

Одним из эффективных способов продления срока хранения кисломолочных продуктов является использование холодочувствительных заквасок. Показано, что среди устойчивых к рифампицину мутантов штамма *Lactobacillus acidophilus* ИНМИА-9602, используемого в качестве закваски диетического кисломолочного продукта “Нарине”, с частотой 1,2 % удастся отобрать холодочувствительные мутанты (CSM), не размножающиеся при минимальной температуре роста. Многие из отобранных мутантов сохраняли характерную для родительского штамма скорость ферментации молока, накопления биомассы, а также титруемую кислотность, вязкость, вкус и консистенцию сквашенного продукта. Один из мутантов CSM-12 по технологическим и органолептическим характеристикам кисломолочного продукта даже превосходил родительский штамм.

Закваска – “Нарине” – рифампицинустойчивые мутанты – холодочувствительные закваски – накопление биомассы – скорость сквашивания – титруемая кислотность

Կաթնամթերքի պահպանման ժամկետը երկարացնելու առավել արդյունավետ միջոցներից է ցրտազգայուն մերանների օգտագործումը: Ցույց է տրվել, որ Նարինե է դիտվել կաթնամթերքի մերան հանդիսացող *Lactobacillus acidophilus* ԻՆՄԻԱ-9602 շտամի ռիֆամպիցինի հանդեպ կայուն մուտանտներից 1,2%-ը չի բազմանում աճի մինիմալ ջերմաստիճանում: Ընտրված ցրտազգայուն (CSM) մուտանտների զգալի մեծամասնությունը կաթի ֆերմենտացիայի արագությամբ, կենսազանգվածի կուտակմամբ, ինչպես նաև թթվայնությամբ, մածուցիկությամբ, համով և կոնսիստենցիայով չեն զիջում ծնողական շտամին: Նրանցից *L. acidophilus* CSM-12 մերանը տեխնոլոգիական և կաթնամթերքի օրգանոլեպտիկ հատկանիշներով նույնիսկ գերազանցում է ծնողական շտամին:

Պրոբիոտիկ կաթնամթերք – Նարինե – ռիֆամպիցին կայուն մուտանտներ – ցրտազգայուն մերան – կենսազանգվածի կուտակում – մերան արագություն – տիտրվող թթվայնություն

The use of cold-sensitive starter cultures is an effective way to increase the shelf life of milk products. It has been revealed that from rifampicin-resistant mutants of *Lactobacillus acidophilus* INMIA 9602, which serves as starter for fermentation of probiotic dairy food “Narine”, 1.2 % aren’t propagate under minimal temperature. Numerous of rif cold sensitive CSM mutants retained properties of parental strain rate of milk fermentation, biomass accumulation, as well as titratable acidity, viscosity, flavor and texture of fermented milk. One of the mutants CSM-12 possesses even better technological and organoleptic characteristics.

The starter of dietary sure-milk product “Narine” – rifampicin-resistant mutants – cold sensitive mutants – biomass accumulation – milk fermentation – titratable acidity

Срок хранения молочных продуктов во многом определяется способностью заквасочных культур проявлять метаболическую активность в период стабилизации (созревания) и хранения при низких температурах. Повышение чувствительности заквасочных культур к низким температурам может способствовать сохранению качества кисломолочных продуктов в более длительное время.

Предельные температуры роста микроорганизмов в основном определяются термочувствительностью одного или нескольких белков. Повышение холодочувствительности одновременно нескольких белков при помощи мутаций очень трудоемкий процесс. В таких случаях идут путем получения ступенчатых мутаций, что требует много времени и материальных затрат. С другой стороны, мутационные изменения термочувствительности ключевых белков, участвующих в таких глобальных процессах клетки какими являются редупликация ДНК, транскрипция РНК, биосинтез белков или деление клетки, могут привести к термочувствительному фенотипу клетки. Известно также, что мутации компонентов белок синтезирующего аппарата (РНК полимеразы, рибосом, аминацил т-РНК синтаз и т-РНК) нередко обладают плейотропным действием, выражающемся в одновременном изменении целого ряда свойств (признаков) клетки [1, 2, 5, 8, 9, 10, 12, 17]. Наиболее выраженным плейотропным эффектом обладают мутации, приводящие к рифампицин и/или стрептомицин устойчивости, затрагивающие биосинтез РНК и белков. Ранее нами было показано, что среди устойчивых к рифампицину мутантов молочнокислых бактерий с достаточно высокой вероятностью можно отобрать штаммы, обладающие плейотропным фенотипом, проявляющимся в изменении морфологии колоний, удельной скорости роста, скорости сквашивания молока, титруемой кислотности и органолептических свойств сквашенного продукта [5, 6, 7].

Целью настоящей работы является отбор холодочувствительных мутантов у штамма *Lactobacillus acidophilus* ИНМИА-9602 с использованием мутаций, придающих устойчивость к рифампицину.

Материал и методика. Закваску кисломолочного диетического продукта "Нарине" штамм *Lactobacillus acidophilus* ИНМИА-9602, имеющий оптимальную (T_{opt}) 37-42°C, минимальную (T_{min}) 21°C и максимальную (T_{max}) 48°C температуры роста, получили из Республиканского центра депонирования микроорганизмов (РЦДМ), г. Абовян, Армения.

Питательные среды LAPT_g бульон, LAPT_g агар [16] и обезжиренное молоко.

Спонтанные, устойчивые к рифампицину мутанты, получали высеvom около 10^9 клеток *L. acidophilus* 9602 на LAPT_g агар при 100 мкг/мл рифампицина.

Чувствительность культур к температуре определяли с помощью игольчатого репликатора с 50-ю гнездами, куда заливали по 0,3 мл физиологического раствора и с помощью стерильной иглы инокулировали колонии, чашки-реплики ставили на разные температуры и после роста отбирали не выросшие при пермиссивных температурах мутанты. Для определения накопления биомассы мутантов ночные культуры в соотношении 1/1000 инокулировали в LAPT_g бульоне, инкубировали при разных температурах и на следующий день определяли оптические плотности (ОП) на фотокolorиметре КФК-2МП при длине волны 590 нм.

Для определения скорости свертывания молока из ночных культур по 0,2 мл переносили в пробирки, содержащие 1,8 мл стерильного обезжиренного молока, ставили в термостат на 37°C и регистрировали время образования сгустков [4]. Кислотность ферментированного молока определяли титриметрическим методом, выражая в градусах Тернера (°Т) [4, 15].

Все эксперименты проводили в 3-5 повторностях. Статистический анализ полученных данных проводили с использованием теста Стьюдента, принимая значение критерия $p < 0,05$ достаточным для достоверной разницы в результатах.

Результаты и обсуждение. На основании ранее полученных данных по определению минимальной ингибирующей концентрации (МИК) рифампицина, которая составляла < 20 мкг/мл [5], отбор устойчивых к рифампицину мутантов проводили на среде LAPT_g, содержащей 100 мкг/мл рифампицина высевам $(3-5) \times 10^9$ клеток штамма ИНМИА 9602. Частота встречаемости устойчивых к рифампицину (*Rif^r*) колоний составляла $\sim 10^{-8}$. Среди проверенных 500 *Rif* мутантов при T_{min} (21°C) *L. acidophilus* ИНМИА-9602 удалось отобрать шесть штаммов, утративших способность расти при минимальной перmissive температуре, названные CSM (cold sensitive mutant).

Результаты определения МИК рифампицина и роста при предельных перmissive температурах у холодочувствительных CSM мутантов в LAPT_g бульоне приведены в табл.1.

Табл. 1. Устойчивость к рифампицину и температурный профиль CSM культур

Штаммы	МИК рифампицина, мкг/мл	Удельная скорость роста, ч ⁻¹	Предельные и оптимальные температуры роста, °C		
			T_{min}	T_{opt}	T_{max}
9602	> 20	0.38±0.2	21	37 - 42	48
CSM12	> 1600	0.48±0.4	27	37 - 42	48
CSM131	> 1600	0.28±0.3	24	37 - 42	48
CSM231	> 1600	0.31±0.3	30	37 - 42	48
CSM332	> 1600	0.25±0.4	24	37 - 42	45
CSM373	> 800	0.38±0.2	24	37 - 42	45
CSM413	> 800	0.43±0.25	30	37 - 45	48

Как видно из табл. 1, по устойчивости к рифампицину мутанты превосходят родительский штамм от 40 до 80 раз. Так, у четырех мутантов МИК рифампицина была выше 1600 мкг/мл, а у оставшихся двух – выше 800 мкг/мл. В присутствии указанных концентраций антибиотика мутанты сохраняли способность к свертыванию молока. Определение минимальной температуры роста выявило, что за счет *rif^r* мутаций минимальные температуры роста у GSM мутантов повысились от 3 до 9 градусов. При этом оптимальная температура роста у мутантов не изменилась, оставаясь в пределах 37–42°C. Влияние *rif^r* мутаций отразилось также на удельной скорости роста (μ). Наивысшей удельной скоростью роста обладал мутант CSM-12, а наименьшей CSM-332, остальные существенно не отличались от родительского штамма. У двух мутантов, CSM-332 и CSM-373 T_{max} снизилась до 45°C.

В связи с тем, что основным показателем качества пробиотического продукта является количество жизнеспособных микроорганизмов [14], у CSM мутантов была изучена способность к накоплению биомассы при указанных в табл. 1 критических для каждого температурах роста. Накопление биомассы CSM мутантов определяли по оптической плотности, после 18 ч роста в LAPT_g бульоне при оптимальной и субэкстремальных температурах (рис.1).

Как видно из рис. 1, при T_{opt} наибольшее накопление биомассы наблюдается у мутантов CSM 12 и CSM 413, остальные мутанты по этому признаку мало отличались от родительского штамма. Эти два мутанта, по сравнению с остальными, при температурах 37–42°C в среде LAPT_g, обладали более высокой удельной скоростью роста. При субэкстремальных температурах уровень накопления биомассы мутантов (кроме CSM 12 и CSM 413) незначительно отличался от родительского штамма.

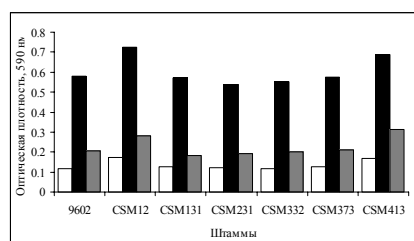


Рис. 1. Накопление биомассы в среде LAPTg при минимальных (светлые столбцы), оптимальных (темные столбцы) и максимальных (серые столбцы) температурах.

Показано, что в процессе ферментации молока температура является одним из основных факторов, влияющих на скорость свертывания, текстуру и органолептические качества конечного кисломолочного продукта [3, 13]. В связи с этим была изучена температурная зависимость ферментации молока мутантными культурами. Ферментации проводились в диапазоне температур от 21°C до 48°C.

Как видно из табл. 2, все мутанты в изученном диапазоне температур с разной скоростью свертывали молоко. При этом свертывание молока при предельных температурах протекало значительно медленнее, чем при оптимальной (табл. 2).

Табл. 2. Скорость свертывания молока CSM мутантами при различных температурах

Штаммы	Температурный профиль ферментации молока, °C							
	21	24	27	30	37	42	45	48
9602	+	+	++	++	+++	+++	++	++
CSM12	-	-	-	++	++++	+++	+++	++
CSM131	-	+	++	++	+++	+++	+++	+++
CSM231	-	-	-	++	+++	+++	+++	++
CSM332	-	++	++	++	+++	+++	++	-
CSM373	-	-	-	++	+++	+++	++	-
CSM413	-	-	-	++	++++	+++	+++	++

- не сквашивает; + сквашивает за 24 часа; ++ сквашивает за 12 часов;
+++ сквашивает за 6-8 часов; ++++ сквашивает за <6 часов.

Были изучены технологический профиль мутантных культур и органолептические свойства ферментированных ими кисломолочных продуктов при оптимальной температуре (табл.3).

Табл. 3. Скорость сквашивания молока CSM заквасками и качество кисломолочных продуктов

Мутант	Скорость свертывания молока, час	Титруемая кислотность, °T	Вязкость, мПа·с	Вкус	Консистенция
9602	5.25±0.4	80±12	146	кислый	тягучая
CSM12	4.25±0.25	70±18	181	слабокислый	слабо тягучая
CSM131	6.75±0.4	85±10	111	невывраженный	тягучая
CSM231	5.5±0.5	82±13	128	кислый	тягучая
CSM332	7.75±0.25	95±8	108	невывраженный	тягучая
CSM373	5.5±0.25	80±21	139	кислый	тягучая
CSM413	5.0±0.3	75±17	176	слабокислый	слабо тягучая

В ряде случаев мутации, определяющие устойчивость к рифампицину, оказывали положительное влияние на скорость ферментации молока. Так, мутант CSM12 на 1 ч быстрее сквашивал молоко, чем контрольная культура, а титруемая кислотность была ниже на 14°Т. Эти показатели были также несколько выше у мутанта CSM413. Мутанты GSM231 и CSM373 ведут себя почти также как исходный штамм. Остальные мутанты (CSM131 и CSM413) имели более низкие скорости сквашивания молока и титруемую кислотность сквашенного продукта.

Таким образом, удалось показать, что среди Rif^r мутантов с частотой около 1,2% можно отобрать холодоустойчивые закваски, не уступающие родительскому штамму по скорости роста, ферментации молока и качеству ферментированного кисломолочного продукта. Обнаруженные отклонения в лучшую или худшую сторону можно объяснить плеiotропным проявлением *rif^r* мутаций [4,5,6]. Один из мутантов, CSM12 по всем технологическим и органолептическим характеристикам превосходил родительский штамм.

ЛИТЕРАТУРА

1. Abad J.P., Amils R. Location of the streptomycin ribosomal binding site explains its pleiotropic effects on protein biosynthesis. *J.Mol.Biol.*, 235, 1251-1260, 1994.
2. Dennis P. Transcription and translation in a pleiotropic streptomycin-resistant mutant of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 137, 1, 197-203, 1979.
3. Beal, C., Skokanova, J., Latrille, E., Martin, N., & Corrieu, G. Combined effects of culture conditions and storage time on acidification and viscosity of stirred yoghurt. *Journal of Dairy Science*, 82, 673–781, 1999.
4. Dairy processing handbook / Ed.G. Bylund. Tetra Pak Processing Systems AB, S221 86 Lund, Sweden, 436, 1995.
5. Hovhannisyan H.G., Barseghyan A.A., Grigoryan N.G., Topchyan A.V. Genetic improvement of technological characteristics of starters for fermented milk products. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 46, 4, 395–399, 2010.
6. Huys G., D'Haene K., Swing J. Influence of the culture medium on antibiotic susceptibility testing of food-associated lactic acid bacteria with the agar overlay disc diffusion method. *Lett. Appl. Microbiol.*, 34, 402-406, 2002.
7. Hummel A.S., Hertel C., Holzapfel W.H., and Franz C.M. A.P. Antibiotic Resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3, 730-739, 2007.
8. Ingham C. J., Furneaux P.A. Mutations in the β subunit of the *Bacillus subtilis* RNA polymerase that confer both rifampicin resistance and hypersensitivity to NusG. *Microbiology*, 146, 3041–3049, 2000.
9. Jin D., J. Gross C.A. Characterization of the pleiotropic phenotypes of rifampin-resistant *rpoB* mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 171, 9, 5229-5231, 1989.
10. Kogoma T. *Escherichia coli* RNA polymerase mutants that enhance or diminish the SOS response constitutively in the absence of RNase HI activity. *J. Bacteriol.*, 176, 5, 1521-1523, 1994.
11. Lucey, J. A., van Vliet, T., Grolle, K., Geurts, T., & Walstra, P. Properties of acid casein gels made by acidification with glucono-delta-lactone. 2. Syneresis, permeability and microstructural properties. *International Dairy Journal*, 7, 389–397, 1997.
12. Maughan H., Galeano B., Nicholson W.L. Novel *rpoB* mutations conferring rifampin resistance on *Bacillus subtilis*: Global effects on growth, competence, sporulation, and germination. *J. Bacteriol.*, 186, 8, 2481–2486, 2004.
13. Radke-Mitchell, L., & Sandine, W. E. Influence of temperature on association growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Dairy Science*, 69, 2558–2568, 1986.

14. Shafiee G., Mortazavian A.M., Mohammadifar M.A., Koushki M.R., Mohammadi A., Mohammadi R. Combined effects of dry matter content, incubation temperature and final pH of fermentation on biochemical and microbiological characteristics of probiotic fermented milk. *African Journal of Microbiology Research*, 4, 12, 1265-1274, 2010.
15. Tamime A.Y., Robinson R.K. *Yoghurt: science and technology*. Woodhead Publishing Ltd., 345 p., 2011.
16. Huys G., D'Haene K., Swing J. Influence of the culture medium on antibiotic susceptibility testing of food-associated lactic acid bacteria with the agar overlay disc diffusion method. *Lett. Appl. Microbiol.*, 34, 402-406, 2002.
17. Vaningelgem F., Zamfir M., Adriany T., De Vuyst L. Biodiversity of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* strains is reflected in their production and their molecular and functional characteristics. *J. of Appl. Microbiol.*, 97, 1257-1273, 2004.
18. Zengel J. M., Young R., Dennis P. P., Nomura M. Role of ribosomal protein S12 in peptide chain elongation: Analysis of pleiotropic, streptomycin-resistant mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 129, 3, 1320-1329, 1977.

Поступила 12.10.2012



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 1(65), 2013

**ՓԱՄԲԱԿ ԵՎ ՏԱՆԶՈՒՏ ԳԵՏԵՐԻ ՖԻՏՈՊԼԱՆԿՏՈՆԱՅԻՆ ՀԱՄԱԿԵՑՈՒԹՅԱՆ
ՏԵՍԱԿԱՅԻՆ ԿԱԶՄԸ, ՆՐԱ ՔԱՆԱԿԱԿԱՆ ԵՎ ՈՐԱԿԱԿԱՆ ԲՆՈՒԹԱԳԻՐԸ (2009-
2010թ.)**

Ա.Ս. ՄԱՄՅԱՆ

*ՀՀ ԳԱԱ Կենդանաբանության և հիդրոէկոլոգիայի գիտական կենտրոնի
Հիդրոէկոլոգիայի և ձկնաբանության ինստիտուտ
a_mamyan@mail.ru*

Կատարվել են անդրասիանային Դեբեդ գետի ջրահավաք ավազանի Փամբակ և Տանձուտ գետերի ֆիտոպլանկտոնային համակեցության ուսումնասիրություններ: Ուսումնասիրվել է պլանկտոնային ջրիմուռների տեսակային կազմը, տրվել նրանց քանակական և որակական ցուցանիշների տարեկան և սեզոնային դինամիկան:

Հայտնաբերվել է պլանկտոնային ջրիմուռների 106 տեսակ, որոնցից 72-ը եղել են դիատոմային, 19-ը՝ կանաչ, 13-ը՝ կապտականաչ և 2-ը՝ դեղնականաչ: Պարզվել է, որ գետերում նախորդ տարիների համեմատ դիտվել է ֆիտոպլանկտոնային համակեցության կենսաբազմազանության ավելացում, արձանագրվել են մոտ 15 տեսակներ, որոնք հայտնաբերված չեն եղել նախորդ տարիներին:

Ֆիտոպլանկտոն – կենսաբազմազանություն – աղտոտվածության ցուցանիշ

Проводились исследования фитопланктонного сообщества водосборного бассейна (рек Памбак и Тандзут) трансграничной реки Дебед. Определены видовой состав, количественные и качественные показатели, годовая и сезонная динамика фитопланктона. Выявлено 106 видов планктонных водорослей, из них: 72 вида – диатомовые, 19 – зеленые, 13 – синезеленые, 2 – желтозеленые. Наблюдалось увеличение биоразнообразия фитопланктонного сообщества, отмечено около 15 видов водорослей, которые не встречались в планктоне рек в предыдущие годы.

Фитопланктон – биоразнообразие – индикаторы загрязнения

The phytoplankton community at the cross-border Pambak and Tandzut rivers belonging to the Debed river catchment basin has been studied.

The plankton algae species composition was identified and the characteristics of their quantitative and qualitative indices annual and seasonal dynamics were given.

The 106 species of plankton algae were found, 72 of them were diatoms, 19 – green, 13 – blue-green and 2 – yellow-green species. The increase in biodiversity in phytoplankton community was shown in comparison to the previous years; there are about 15 species that were not observed in previous years.

Phytoplankton – biodiversity – pollution indicator

Հայաստանի առավել մեծ հոսք ունեցող գետը անդրասիանային Դեբեդն է, որը թափվում է Կուրի վտակ Խրամ գետը: Գետային ավազանները ներկայումս հսկայական անթրոպոգեն ազդեցության են ենթարկվում, գետ են ներթափանցում կենցաղային և տնտեսական թափոններ, գյուղատնտեսական և արդյունաբերական հոսքաջրեր: Այս ամենը ազդում է ջրային համակարգերի էկոլոգիական վիճակի վրա, ինչին արձագանքում են հիդրոբիոտները: Տեղի է ունենում տեսակային սուկցեսիա, կտրուկ նվազում է կենսաբազմազանությունը, հայտնվում են էվտրոֆիկատոր տեսակները:

Ֆիտոպլանկտոնի արտադրանքը, քանակական ցուցանիշները, կենսաբազմազանությունը որոշում են ջրային էկոհամակարգի աղտոտվածությունը և պայմանավորում սանիտարական վիճակը: Ֆիտոպլանկտոնի տեսակային կազմի, նրա սեզոնային և տարեկան դինամիկայի ուսումնասիրությունը հանդիսանում է մակերևութային ջրերի որակի գնահատման կարևորագույն բաղադրիչներից մեկը [7]:

Հաշվի առնելով այդ հանգամանքը, մեր կողմից 2010թ. կատարվել է Դեբեդի ջրահավաք ավազանի Փամբակ և Տանձուտ գետերի ֆիտոպլանկտոնային համակեցության ուսումնասիրություններ, նրա տեսակային կազմի համեմատական վերլուծություն:

Նյութ և մեթոդ: Ֆիտոպլանկտոնային համակեցության ուսումնասիրությունները կատարվել են 2010թթ. հունվար-դեկտեմբեր ամիսների ընթացքում Փամբակ և Տանձուտ գետերից վերցված ջրերի նմուշներում:

Ֆիտոպլանկտոնային համակեցության մոնիտորինգային ուսումնասիրությունների համար ընտրվել են հետևյալ դիտակետերը.

1. Գետ Փամբակ, մինչ Վանաձոր (ասֆալտի արտադրամասի հարակից տարածք), 2. Գետ Փամբակ, Վանաձորի առաջին կամուրջ, 3. Գետ Փամբակ, մինչ Տանձուտ գետին խառնվելը, 4. Գետ Տանձուտ, մինչ Փամբակ գետին խառնվելը, 5. Փամբակ և Տանձուտ գետերի միախառնումից հետո, Վանաձորից ներքև:

Փորձանմուշների նախնական և հետագա լաբորատոր մշակումները կատարվել են ջրակենսաբանության մեջ ընդունված մեթոդների համաձայն [1,6]: Ուսումնասիրվել է ֆիտոպլանկտոնային համակեցության որակական և քանակական կազմը: Ջրիմուռների տեսակային կազմի որոշումը կատարվել է տեսակի իդենտիֆիկացման համընդհանուր ճանաչում գտած որոշիչների և ուղեցույցների օգնությամբ [10,11,12,14,]:

Արդյունքներ և քննարկում: Փամբակը Դեբեդի ամենաերկար վտակն է (երկարությունը 84 կմ), ջրահավաք ավազանը զբաղեցնում է 1370 կմ² մակերես: Տանձուտ գետը Փամբակի աջ վտակն է: Երկարությունը 23 կմ է, ջրհավաք ավազանը՝ 148 կմ² [4]:

Փամբակ և Տանձուտ գետերի ֆիտոպլանկտոնի ուսումնասիրությունների արդյունքում հայտնաբերվել է պլանկտոնային ջրիմուռների 4 խումբ՝ դիատոմային, կանաչ, կապտականաչ և դեղնականաչ:

Այգրոցենոզում, բացառությամբ ամռան ամիսների, քանակապես և որակապես գերակայել են դիատոմային ջրիմուռները, որը բնորոշ է լեռնային արագահոս գետերին [5, 9]: Ըստ որակական ցուցանիշների սուբդոմինանտ խումբ են հանդիսացել կանաչ ջրիմուռները, իսկ ըստ քանակական ցուցանիշների՝ կապտականաչները:

2010 թ. հայտնաբերվել է պլանկտոնային ջրիմուռների 106 տեսակ, որոնցից 72-ը եղել են դիատոմային, 19-ը՝ կանաչ, 13 - ը՝ կապտականաչ և 2 դեղնականաչ խմբի ջրիմուռների ներկայացուցիչներ (աղ.1):

2009 թ. համեմատ 2010 թ. ֆիտոպլանկտոնային համակեցությունում տեղի է ունեցել տեսակային կազմի փոփոխություն, նկատվել է պլանկտոնային ջրիմուռների կենսաբազմազանության աճ: Ֆիտոպլանկտոնում արձանագրվել են 15 նոր տեսակներ՝ երեքը կապտականաչ, 11-ը՝ կանաչ, 1-դեղնականաչ ջրիմուռների խմբում: Տեսակային կազմը աճել է նաև 2005թ. համեմատ, երբ դիատոմային ջրիմուռների խումբը ներկայացված է եղել 32, (այժմ 72), իսկ կապտականաչները 8 տեսակներով, (այժմ 13): Կանաչ ջրիմուռների խմբում 2010թ. հայտնաբերվել է 19, իսկ 2005թ.՝ 25 տեսակ, որոնցից միայն 8 տեսակ են հանդիպել պլանկտոնի կազմում 2010թ-ին՝ *Ankistrodesmus falcutus*, *Closterium protum*, *Botriococcus braunii*, *Scenedesmus quadricauda*, *Scenedesmus armatus*, *Tetraedron muticum*, *Dictiosphaerium pulchellum*, *Coelastrum microporum* [2], (աղ.1):

2009 թ. տվյալների համեմատ 2010թ. դիատոմային ջրիմուռների թվաքանակը նվազել է, իսկ կենսազանգվածը աճել [3]: Թվաքանակի և կենսազանգվածի առավելագույն ցուցանիշներ գրանցվել են հունվարին, 2 դիտակետում, կազմելով համապատասխանաբար 1.308 հազ. բջ./լ՝ ըստ թվաքանակի և 10.7 գ/մ³՝ ըստ կենսազանգվածի: Դիատոմային ջրիմուռների խմբում գերակայել են *Navicula gracilis*, *Navicula distans*, *Navicula rhynchocephala*, *Cymbella prostrata*, *Cymbella lanceolata*, *Pinnularia microstauron*, *Fragilaria capucina* բեկթիկ տեսակները [8,13], ընդ որում դիատոմայինների դոմինանտ կազմում գերակշռել են *Navicula* ցեղի խոշորաբջիջ ներկայացուցիչները, կազմելով գերակա կազմի մոտ 50% -ը, որով էլ բացատրվում է դիատոմային ջրիմուռների մեծ կենսազանգվածը 2009 թ. համեմատ:

Աղ.1. Փամբակ և Տանձուտ գետերի ֆիտոպլանկտոնային ջրիմուռների տեսակային կազմը 2009-2010թթ.

	Cyanophyta	Սապրոբայության աստիճանը	2009	2010
1.	Aphanothece clathrata W. et. G. S.West	+ bms	+	+
2.	Microcystis aeruginosa Kutz.	+bms	+	+
3.	Aphanizomenon flos-aquae (L.) Ralf	+bms	+	+
4.	Phormidium papyraceum (Ag.) G.	o/bms	+	+
5.	Phormidium retzii Gom.	-	-	+
6.	Phormidium autumnale Gom.	-	-	+
7.	Phormidium foveolarum Gom.	-	-	+
8.	Oscillatoria limosa Ag. F. limosa	a/bms	+	+
9.	Oscillatoria limnetica Lemm.	o/bms	+	+
10.	Oscillatoria irrigua Gom.	-	-	+
11.	Spirulina platensis	-	+	+
12.	Spirulina subsalsa Oerst.	-	+	+
13.	Merismopedia tenuissima Lemm.	+ b/ams	+	+
	Bacilariophyta		2009	2010
1.	Navicula hungarica Grun.	bms	+	+
2.	Navicula pupula Kiitz. var. pupula	+ bms	+	+
3.	Navicula gracilis Ehr.	+ os/bms	+	+
4.	Navicula rhynchocephala Kiitz. var. rhynchocephala	ams	+	+
5.	Navicula cryptocephala Kiitz. var. cryptocephala	ams	+	+
6.	Navicula distans W. Sm.	-	+	+
7.	Navicula directa W. Sm.	-	+	+
8.	Navicula tuscula Ehr. Grun. var. tuscula	-	+	+
9.	Navicula radiosa Kiitz. var. tenella	xs/os	+	+
10.	Navicula atomus (Nag.) Grun.	-	+	+
11.	Navicula dicephala var. elginensis (Greg.) Grun	os	+	+
12.	Navicula lanceolata (Ag.) Kutz. var. lanceolata	-	+	-
13.	Navicula placentula Ehr. Grun. var. placentula	-	+	-
14.	Fragilaria construens Ehr.) Grun. var. construens	bms	+	+
15.	Fragilaria capucina Desm. var. capucina	o/bms	+	+
16.	Fragilaria crotonensis Kitt.	+ o/bms	+	+
17.	Melosira varians Ag.	+ bms	+	+
18.	Melosira moniliformis	-	+	+
19.	Denticula elegans Kutz.	-	+	+
20.	Meridion circulare var. constrictum (Ralfs) V.H.	+ os	+	+
21.	Diatoma vulgare Bory var. vulgare	+ bms	+	+
22.	Diatoma hiemale var. mesodon (Ehr.) Grun.	xs	+	+
23.	Ceratoneis arcus (Ehr.) Kiitz. var. arcus	+x/os	+	+
24.	Synedra acus Kutz. var. acus	bms	+	+
25.	Synedra ulna var. danica (Kiitz.) Grun	os	+	+
26.	Synedra tabulata Ag. Kutz.	-	+	+
27.	Achnanthes minutissima Kiitz. var. cryptocephala Grun	+ os/bms	+	+
28.	Achnanthes taeniata Grun.	-	+	+
29.	Cocconeis placentula Ehr. var. Placentula	+os/bms	+	+
30.	Stauroneis anceps Ehr. var. anceps	bms	+	+
31.	Rhoicosphenia curvata Kiitz.) Grun. var. curvata	+ bms	+	+
32.	Pinnularia viridis var. sudetica (Hilse) Hust	xs/os	+	+
33.	Pinnularia leptosoma Grun.	-	+	+
34.	Pinnularia fasciata (Lagerst) Hust.	-	+	+
35.	Pinnularia subcaptita Greg. var. hilseana (Janisch.) O.Mwill	xs/os	+	+
36.	Pinnularia major (Kutz.) Cl.	bms	+	+
37.	Pinnularia microstauron (Ehr.) Cl. var. microstauron	x/os	+	+
38.	Pinnularia oblonga Kutz.	-	+	+
39.	Amphora ovalis pediculus Kiitz.	bms	+	+
40.	Amphora veneta Kutz. var. veneta	bms	+	+
41.	Cymbella affinis Kutz.	bms	+	+
42.	Cymbella cistula (Hemp.) Grun. var. cistula	bms	+	+
43.	Cymbella helvetica Kutz. var. helvetica	xs	+	+

44.	<i>Cymbella tumida</i> (Berb.) V. H.		+	+
45.	<i>Cymbella ventricosa</i> Kutz., var. <i>ventricosa</i>	os/bms	+	+
46.	<i>Cymbella lanceolata</i> (Ehr.) V.H. var. <i>lanceolata</i>	bms	+	+
47.	<i>Cymbella prostrata</i> Brec. Cl.	+ bms	+	+
48.	<i>Gyrosigma</i> (Kutz.) Rabenh. var. <i>acuminatum</i> .	bms	+	+
49.	<i>Gomphonema olivaceum</i> (Lyngb.) Kütz. var. <i>olivaceum</i>	bms	+	+
50.	<i>Gomphonema quadropunctatum</i> (Oestr.) Wisl.		+	+
51.	<i>Gomphonema angustatum</i> Kutz. Rabh.	os/bms	+	+
52.	<i>Nitzschia linearis</i> W. Sm. var. <i>linearis</i>	os/bms	+	+
53.	<i>Nitzschia angustata</i>		+	+
54.	<i>Nitzschia microcephala</i> Grun.		+	+
55.	<i>Nitzschia subtilis</i> Kutz. Grun.		+	+
56.	<i>Nitzschia hungarica</i> Grun. var. <i>hungarica</i>	ams	+	+
57.	<i>Nitzschia palea</i> (Kutz.) W. Sm.	ams	+	+
58.	<i>Nitzschia kuetzingiana</i> Hilse		+	+
59.	<i>Nitzschia microcephala</i> Grun.	bms	+	+
60.	<i>Nitzschia sigmoidea</i> (Ehr.) W. Sm. var. <i>sigmoidea</i>	bms	+	+
61.	<i>Hantzschia amphioxys</i> (Ehr.) Grun. var. <i>amphioxys</i>	ams	+	+
62.	<i>Epithemia sorex</i> Kutz. var. <i>sorex</i>	bms	+	+
63.	<i>Surirella ovata</i> Kutz. var. <i>ovata</i>	+bms	+	+
64.	<i>Surirella robusta</i> Ehr. var. <i>splendida</i> Ehr.	bms	+	+
65.	<i>Surirella angustata</i> Kutz.		+	+
66.	<i>Asterionella formosa</i> Hass. var. f.	+o/bms	+	+
67.	<i>Cymatopleura solea</i> (Breb.) W. Sm. var. <i>solea</i>	b/ams	+	+
68.	<i>Cymatopleura elliptica</i> (Breb.) W. Sm. var. <i>elliptica</i>	bms	+	+
69.	<i>Cyclotella comta</i> Ehr. Kutz. var. <i>comta</i> .	os	+	+
70.	<i>Cyclotella kuetzingiana</i> Thw. var. <i>kuetzingiana</i>	+ bms	+	+
71.	<i>Stephanodiscus hantzschii</i> Grun.	+ ams	+	+
72.	<i>Tabelaria flocculosa</i> (Roth) Kutz.	os/xs	+	+
73.	<i>Tabelaria fenestrata</i> (Lyngb.) Kutz.	os/bms	+	+
74.	<i>Didymosphenia geminata</i> (Lyngb.) M. Schmidt		+	+
Clorophyta			2009	2010
1.	<i>Ankistrodesmus falcatus</i> (Corda) Ralfs. var. <i>falcatus</i>	b/ams	+	+
2.	<i>Closterium acutum</i> (Lyngb.) Breb. var. <i>acutum</i>	b/ams	+	+
4.	<i>Closterium kutz.</i>		-	+
5.	<i>Closterium venius</i>		-	+
6.	<i>Closterium protum</i>		+	+
7.	<i>Botriococcus braunii</i> Kutz.	+ os/bms	+	+
8.	<i>Ulotrix subtilissima</i> Rabenh.	o/ams	+	+
9.	<i>Scenedesmus quadricauda</i> (Trup.) (Breb)	+ bms	-	+
10.	<i>Scenedesmus armatus</i>		-	+
11.	<i>Scenedesmus falcatus</i> Chodat	bms	-	+
12.	<i>Tetraedron muticum</i>	bms/ams	-	+
13.	<i>Staurastrum muticum gracile</i> Ralfs. var. <i>gracile</i>	os/bms	-	+
14.	<i>Staurastrum manfeldtii</i> Delponte		-	+
15.	<i>Dictiosphaerium</i> var. <i>pulchellum</i>	bms	+	+
16.	<i>Cruciginia fenestrata</i> (Schmidle)		-	+
17.	<i>Coelastrum microporum</i> Nag.	bms	-	+
18.	<i>Oocystis lacustris</i> Chodat	bms/os	+	+
19.	<i>Treubaria triappendicula</i>		+	+
Xantophyta				
1.	<i>Tribonema vulgare</i> Pasch.	x-os	+	+
2.	<i>Tribonema monchloron</i>		-	+

a ms- ալֆա-մեդուսալոր, bms- բետա-մեդուսալոր, os- օլիգոսալոր, xs- քսենոսալոր

Դիատոմային ջրիմուռների նվազագույն թվաքանակ և կենսազանգված՝ 34.0 հազ բջ./լ՝ ըստ թվաքանակի և 0.2գ/մ³՝ ըստ կենսազանգվածի, գրանցվել է N 4 դիտակետում, մարտ ամսին, գետի վարարման շրջանում, երբ գետը դառնում է ավելի ջրառատ և արագահոս: Կապտականաչ ջրիմուռների խմբում տեղի է ունեցել դոմինանտ կազմի փոփոխություն: 2009 թ. դոմինանտող *Oscillatoria limnetica* և *Oscillatoria limosa* տեսակները փոխարինվել են *Oscillatoria irrigua*, *Phormidium retzii*, *Phormidium autumnale* տոքսիկ տեսակներով [3], որոնք պլանկտոնում հայտնվել են 2010թ.:

Կապտականաչ ջրիմուռների քանակական առավելագույն ցուցանիշները՝ 1.522 հազ. բջ./լ՝ ըստ թվաքանակի, 4.2 գ/մ³ և ըստ կենսազանգվածի, գրանցվել են N5

դիտակետում (Վանաձորից ներքև), հուլիսին, երբ ջերմաստիճանային պայմանները եղել են օպտիմալ և բարձր է եղել նաև օրգանական նյութերի կոնցենտրացիան (համաձայն շրջակա միջավայրի վրա ներգործության մոնիտորինգի կենտրոնի տվյալների): Կապտականաչ ջրիմուռների նվազագույն քանակական արժեքները՝ 1.0 հազ. բջ/լ՝ ըստ թվաքանակի և 0.003 գ/մ³՝ ըստ կենսազանգվածի, գրանցվել են N 1 դիտակետում, մարտին՝ գետի վարարման շրջանում:

2010 թ. տեղի է ունեցել նաև կանաչ ջրիմուռների տեսակային կազմի փոփոխություն: Գետի պլանկտոնում աճել է կանաչ ջրիմուռների կենսաբազմազանությունը, խմբում ավելացել են *Closterium kutz.*, *Cl. protum*, *Cl. venius*, *Scenedecmus quadricauda*, *Sc. Armatus*, *Sc. falcutus*, *Tetraodon muticum*, *Staurastrum muticum*, *St. manfeldtil*, *Crucigenia fenestrata*, *Coelastrum microporum* տեսակները [աղ.1]:

2009թ. համեմատ դիտվել է նաև կանաչ ջրիմուռների թվաքանակի և կենսազանգվածի աճ [3]: Թվաքանակը տատանվել է 2400-183 հազ. բջ/լ, իսկ կենսազանգվածը՝ 0.1-0.7 գ/մ³ սահմաններում: Առավելագույն քանակը գրանցվել է օգոստոսին, N 4 դիտակետում, և պայմանավորված է եղել *Coelastrum microporum* և *Ankistrodesmus falcutus* տեսակների զարգացմամբ, իսկ նվազագույն քանակությունը գրանցվել է սեպտեմբերին N 1 դիտակետում:

Դեղնականաչ ջրիմուռների խմբում 2009թ. միակ ներկայացուցիչ է եղել *Tribonema vulgare* տեսակը, իսկ 2010 թ. հանդիպել նաև *Tribonema monochloron* տեսակը: Նրանց առավելագույն քանակական արժեքները գրանցվել է հունիսին, N1 դիտակետում, կազմելով 9.0 հազ. բջ/լ՝ ըստ թվաքանակի և 0.01 գ/մ³՝ ըստ կենսազանգվածի:

2010 թ. հայտնաբերված պլանկտոնային ջրիմուռների մոտ – 50%-ը, (2009թ.՝ 38%) համապատասխանել է ջրերի որակի սապրոբայության bms-խմբին, ams-ները կազմել են 6%, os/bms-13%, bms/ams-9%, մնացածը կազմել են os, xs-os, xs տեսակները միասին:

Այսպիսով, Փամբակ և Տանձուտ գետերի ալգոցենոզի ուսումնասիրությունների վերլուծությունից պարզվել է, որ 2010թ. ֆիտոպլանկտոնում քանակապես և որակապես գերակայել են դիատոմային ջրիմուռները (34.0-1.308.0 հազ բջ/լ և 0.2-10.7 գ/մ³), բացառությամբ ամռան սեզոնի, երբ դոմինանտել են կապտականաչները (թվաքանակը՝ 1.522 հազ. բջ/լ, կենսազանգվածը՝ 4.2 գ/մ³):

Ըստ քանակական ցուցանիշների սուբդոմինանտ են հանդիսացել կապտականաչ, իսկ ըստ կենսաբազմազանության՝ կանաչ ջրիմուռները:

Ուսումնասիրություններից պարզվել է, որ Փամբակ և Տանձուտ գետերի ֆիտոպլանկտոնային համակեցություններում տեղի է ունեցել կենսաբազմազանության ավելացում, արձանագրվել են մոտ 15 տեսակներ, որոնք չեն հանդիպել նախորդ տարիներին: Հայտնաբերված տեսակները հիմնականում պատկանում են ջրերի սապրոբայության bms (բետա-մեզոսապրոբ) խմբին:

Այդ տեսակների առկայությունը պլանկտոնում հավանաբար պայմանավորված է գետի էկոլոգիական պայմանների փոփոխությամբ և տեղի ունեցող տեսակային սուկցեսիայով:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. Գուրևիչ Ա.Ա. Քաղցրահամ ջրերի ջրիմուռներ: Երևան, 140 էջ, 1973:
2. Դանիելյան Ա.Ա. Դեբեդ գետի և նրա ջրահավաք ավազանի էկոլոգիական գնահատականը և տարածքի կայուն զարգացման հեռանկարները: Թեկ. առ., Երևան, էջ 87-88, 2009:
3. Մամյան Ա.Ա., Զալիկյան Ս.Ա., Համբարյան Լ.Ռ., Հովհաննիսյան Ռ.Հ., Մկրտչյան Ժ.Հ. Փամբակ և Տանձուտ գետերի ֆիտոպլանկտոնային համակեցության սեզոնային դինամիկան (2009թ.) Հայաստանի կենսաբ. հանդես, LXIV, 1, էջ 52-55, 2012:
4. Մնացականյան Բ.Պ., Թադևոսյան Գ.Պ. Լոռու կլիման և ջրերը: Վանաձոր “ՄԻՄ տպագրատուն” ՍՊԸ, 290 էջ, 2007
5. Ստեփանյան Լ.Գ., Համբարյան Լ.Ռ., Հովհաննիսյան Ռ.Հ. Հրազդան գետի Երևանյան հատվածի ֆիտոպլանկտոնային համակեցության դինամիկան Հայաստանի կենսաբան. հանդես, LVII, 3-4, էջ 259-262, 2005:
6. Абакумов В.А. Руководство по методам гидробиологического анализа поверхностных вод и донных отложений. Ленинград, Гидрометеиздат, с.78- 86., 1983.
7. Барнинова С.С., Медведева Л.А. Атлас водорослей индикаторов сапробности (российский Дальний Восток), Владивосток, Дальнаука, 365с., 1996.
8. Давыдова Н.Н. Диатомовые водоросли – индикаторы природных условий водоемов в голоцене. Ленинград, Изд. “Наука”, 243с., 1985.

9. *Иванова А.П.* Флора водорослей планктона водоемов бассейна нижнего течения реки Учур (южная Якутия). Биоразнообразие, проблемы экологии Горного Алтая и сопредельных регионов: настоящее, прошлое, будущее. Материалы II международной конференции. г. РИО ГАГУ, с .96-101, 2010.
10. Киселев И.А., Зинова А.Д., Курсанов Л.И.. Определитель низших растений. Водоросли, 2, М., Сов. Наука, 312с., 1953.
11. *Прошкина-Лавренко А.И., Макарова И.В.* Водоросли Каспийского моря. Ленинград, "Наука", 205с., 1968.
12. *Судницына Д.Н.* Экология водорослей Псковской области, Псков, 2005.
13. *Царенко П.М.* Краткий определитель хлорококковых водорослей Украинской ССР Киев, 206 с., 1990.
14. *Heinz Streble*, Das Leben im Wassertropfen, Stuttgart, Kosmos, 2001.

Մտագրվել է 07.05.2012



Биолог. журн. Армении, 1 (65), 2013

СЕРООКИСЛЯЮЩАЯ БАКТЕРИЯ, ВЫДЕЛЕННАЯ ИЗ ПУЛЬПЫ БИОВЫЩЕЛАЧИВАНИЯ ЦИНКОВОГО КОНЦЕНТРАТА

А.К. ВАРДАНЯН, А.Н. ХАЧАТРЯН, Л.С. МАРКОСЯН,
ВАРДАНЯН

Н.С.

НПЦ “Армбиотехнология” НАН РА, Институт микробиологии
avivardan@gmail.com, nvard@sci.am

Изучены основные фенотипические свойства штамма SO-1 сероокисляющей бактерии, выделенной из пульпы выщелачивания цинкового концентрата. Клетки бактерии представляют собой палочки размером 0,3-0,5 x 0,7-2,0 мкм. Способны окислять элементарную серу и тетрагидрат. Оптимальные условия роста – 35°C и pH 2,7-3,0. Выделенный штамм SO-1 является факультативным хемолитоавтотрофом. Дрожжевой экстракт в концентрации 0,005-0,01% стимулирует рост бактерии и окисление элементарной серы. Анализ нуклеотидной последовательности 16S рРНК показал, что выделенный штамм SO-1 образует единый кластер с соответствующей нуклеотидной последовательностью типового штамма *Acidithiobacillus thiooxidans* ATCC 19377, имея с ним уровень сходства 97,5%. Штамм SO-2 сероокисляющей бактерии, выделенной ранее из пульпы выщелачивания медного концентрата, проявляет высокий уровень сходства с соответствующей нуклеотидной последовательностью типового штамма *Acidithiobacillus albertensis* DSM-14366. Можно сделать вывод, что штамм SO-2 является штаммом вида *A. albertensis*, а штамм SO-1, участвующий в окислении цинкового концентрата, является новым видом рода *Acidithiobacillus*, отличным от *A. thiooxidans*.

Сероокисляющие бактерии – цинковый концентрат-нуклеотидная последовательность –идентификация бактерий

Ուսումնասիրվել են ցինկի խտանյութի տարրավազման պուլպից մեկուսացված ծծումբ օքսիդացնող բակտերիայի հիմնական ֆենոտիպական հատկանիշները: Բջջիները ձողաձև են, 0,3- 0,5 x 0,7-2,0 մկմ մեծության: Բակտերիան ընդունակ է օքսիդացնելու էլեմենտային ծծումբ և տետրադիմիտ: Աճի օպտիմալ ջերմաստիճանը 35°C է, pH-ի օպտիմալ արժեքները՝ 2,7-3,0: Մեկուսացված SO-1 շտամը հանդիսանում է ֆակուլտատիվ քեմոլիտոտրոֆ: Խմորասնկային էքստրակտը 0,005-0,01% խտության դեպքում խթանում է բակտերիայի աճը և ծծմբի օքսիդացումը: 16S ռԲՆԹ-ի նուկլեոտիդային հաջորդականության անալիզը ցույց է տվել, որ մեկուսացված բակտերիան առաջացնում է միասնական կլաստեր *Acidithiobacillus thiooxidans* ATCC 19377 տիպային շտամի համապատասխան նուկլեոտիդային հաջորդականության հետ՝ ցուցաբերելով 97,5% նմանություն: Պղնձի խտանյութի պուլպից նախկինում մեկուսացված ծծումբ օքսիդացնող SO-2 շտամը ցուցաբերել է նմանության բարձր մակարդակ *Acidithiobacillus albertensis* DSM-14366 տիպային շտամի համապատասխան հաջորդականության հետ: Եզրակացվում է, որ SO-2 շտամը պատկանում է *A. albertensis* տեսակին, իսկ ցինկի խտանյութի տարրավազման մասնակցող SO-1 շտամը հանդիսանում է *A. thiooxidans*-ից տարբեր *Acidithiobacillus* գեղի նոր տեսակ:

*Ծծումբ օքսիդացնող բակտերիաներ – ցինկի խտանյութ-նուկլեոտիդային
հաջորդականություն – բակտերիաների նույնացում*

The main phenotypic features of sulfur-oxidizing bacteria str.SO-1 isolated from leaching pulp of zinc concentrate have been studied. The cells of bacteria are rods in the size 0,3-0,5x0,7-2,0 mkm. They are capable of oxidizing elemental sulfur and tetrathionate with optimal temperature of growth 35°C and pH 2,7-3,0. The isolated str. SO-1 is considered to be a facultative chemolithoautotrophic. Yeast extract in the concentrations range of 0,005-0,01% stimulates the growth of bacteria and oxidation of element sulfur. The analysis of 16S rRNA gene sequences has shown that the isolated str. SO-1 forms a single cluster with corresponding sequences of a type strain of *Acidithiobacillus thiooxidans* ATCC 19 377 having with it 97,5% similarity. Str.SO-2 of sulfur-oxidizing bacteria isolated earlier from leaching pulp of copper concentrate shows a high level of similarity with corresponding sequences of a type strain of *Acidithiobacillus albertensis* DSM-14366. It is concluded that str.SO-2 represents a strain of genus *A. albertensis* while str.SO-1 participating in the oxidation of zinc concentrate is a new species of genus *Acidithiobacillus* distinct from *A.thiooxidans*.

Sulfur oxidizing bacteria – zinc concentrate-gene sequences – identification of bacteria

Ведущую роль в окислении элементарной серы в природных условиях и в искусственных системах выщелачивания играет экстремально ацидофильная бактерия *A.thiooxidans* (= *Thiobacillus thiooxidans*) [4]. К настоящему времени выделен ряд других облигатно автотрофных ацидофильных бактерий, способных окислять элементарную серу [8,16,18]. Однако из них только *Thiobacillus albertensis* [8] и *Acidithiobacillus caldus* [15] описаны как отдельные виды, тогда как остальные бактерии (*Thiobacillus concretivorus*, *Thiobacillus kabobis*, *Thiobacillus capsulatus*), ввиду отсутствия существенных различий от *A. thiooxidans*, в последнем издании Берги были отнесены к синонимам *A.thiooxidans* [6]. Позднее на основании изучения нуклеотидной последовательности 16S рРНК *Thiobacillus albertensis* был включен во вновь созданный род *Acidithiobacillus*. Среди указанных бактерий особый интерес ученых привлекает *A.caldus*, способная окислять элементарную серу при повышенных температурах. По данным ряда исследователей, *A.caldus* является основной сероокисляющей бактерией в установках биоокисления золотосодержащих концентратов, функционирующих при 40°C [13,14]. По мнению авторов, роль *A. caldus* в сообществе хемолитотрофных бактерий в процессе биоокисления арсенопирита заключается в удалении ингибирующего слоя серы, образующегося на поверхности минерала или в обеспечении миксотрофного и гетеротрофного роста других серо- и железоокисляющих бактерий [12].

Что касается *A. albertensis*, то практически отсутствуют данные о потенциальной роли этой бактерии в биотехнологии металлов.

Проведенные нами ранее исследования по выщелачиванию комплексных медных и цинковых концентратов природной ассоциацией хемолитотрофных бактерий показали, что в процессе их бактериального окисления под действием соответствующих физико-химических и минералогических факторов формируются особые по своему составу сообщества, состоящие преимущественно из сероокисляющих бактерий, а также железоокисляющих лептоспирилл, наиболее адаптированных к условиям выщелачивания данных концентратов.

Из пульпы бактериального выщелачивания указанных концентратов были изолированы в чистую культуру два штамма мезофильных сероокисляющих бактерий [2,5].

Целью настоящих исследований явилось изучение основных фенотипических свойств сероокисляющих бактерий, выделенных нами из пульп выщелачивания цинкового и медного концентратов и их идентификация на основании анализа нуклеотидной последовательности 16S рРНК.

Материал и методика. Объектом исследования служили сероокисляющие бактерии шт. SO-1 и шт. SO-2, выделенные из пульпы выщелачивания медного и цинкового концентратов. Инокуляционным материалом для получения накопительной культуры служили пробы пульпы выщелачивания. Выделение бактерий проводили на среде 9К, используя в качестве источника энергии элементную серу в виде порошка. Селу стерилизовали отдельно текучим паром и добавляли к среде непосредственно перед высевом, рН среды устанавливали 3,0-3,5 с помощью 10 N H₂SO₄. Инкубирование проводили в стационарных условиях при 37°C. Чистую культуру получали путем посева на твердую среду, содержащую 0,6% агарозы (Serva) и 5 мМ тетрагидрата натрия (Na₂S₄O₆ · 2H₂O) в качестве источника энергии. Чистоту выделенных культур проверяли посевом на ту же среду, содержащую 0,05 и 0,1% дрожжевого экстракта или глюкозы.

Окрашивание клеток по Граму проводили по методу Хукера [3]. Спорообразование проверяли посевом клеток после термальной обработки (кипячение в водяной бане в течение 30 мин) в вышеуказанную питательную среду, а также окрашиванием спор [3] и прямым микроскопированием.

Опыты по изучению физиологических особенностей проводили в стационарных условиях. О росте бактерий судили по увеличению оптической плотности среды, снижению рН, а также по интенсивности образования SO₄²⁻ в результате окисления элементной серы. Сульфат-ионы определяли по методу Додгсона [11].

Клетки просматривали под микроскопом Leica DM500 trinocular (Ч1000), Программное обеспечение Digital Camera EC3 Leica Microsystem (Ч10).

Выделение ДНК из биомассы бактерий проводили согласно методу Бирнбойма и Доли [7]. Концентрация полученных препаратов ДНК при использовании данного метода составляла 30-50 мкг/мл.

ПЦР гена 16S рРНК. Для проведения полимеразной цепной реакции и дальнейшего секвенирования ПЦР-фрагментов гена 16S рРНК была использована универсальная праймерная система [19]. Объем амплификационной смеси составлял 50 мкл и имел следующий состав: 1× буфер ДНК полимеразы BioTaq (17 мМ (NH₄)₂SO₄, 67 мМ трис-НСl, рН 8,8, 2 мМ MgCl₂); по 12,5 нмоль каждого из dNTP, 50 нг ДНК-матрицы; по 5 пмоль соответствующих праймеров и 3 ед. ДНК полимеразы BioTaq (Диалат ЛТД, Россия).

Температурно-временной профиль ПЦР был следующим: первый цикл – 94°C x 9 мин, 55°C x 1 мин, 72°C x 2 мин; последующие 30 циклов – 94°C x 1 мин, 55°C x 1 мин, 72°C x 2 мин; завершающий цикл – 72°C x 7 мин.

Выделение и очистку продуктов ПЦР проводили из легкоплавкой агарозы с применением набора реактивов Wizard PCR Preps (Promega, США), согласно рекомендациям производителя.

Секвенирование ПЦР-продуктов. Секвенирование полученных ПЦР-фрагментов генов, кодирующих 16S рРНК, проводили по методу Сэнгера с соват. [20] с помощью набора реактивов Big Dye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, Inc., USA) на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems, Inc., USA) согласно инструкциям производителя. При этом для секвенирования использовали праймеры [19], и чтение проводили в двух направлениях.

Анализ нуклеотидных последовательностей 16S рРНК. Первичный анализ сходства нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК изучаемых штаммов проводили с помощью программного пакета BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) [19].

Результаты и обсуждение. *Микробиологический анализ пульпы.* Исследованиями выявлено, что в процессе выщелачивания цинкового и медного концентратов природной ассоциацией хемолитотрофных бактерий к концу опыта в пульпах доминировали сероокисляющие бактерии. Их количество достигало 10⁸–10⁹ кл./мл, в то же время численность железоокисляющих бактерий, представленных *Leptospirillum* spp. бактериями и *Acidithiobacillus ferrooxidans*, не превышала 10⁴–10⁵ кл./мл. Это объясняется тем, что по мере выщелачивания указанных концентратов, условия в пульпе меняются и становятся более благоприятными для роста сероокисляющих бактерий. Как уже отмечалось нами ранее, это связано с накоплением в среде эле-

ментной серы – продукта химического и бактериального окисления (особенно бактериями *Leptospirillum spp.*) минералов цинка и меди [2, 5].

Культуральные и морфологические свойства. Из пульпы выщелачивания цинкового и медного концентратов природной ассоциацией ХБ были изолированы два штамма грамтрицательных сероокисляющих бактерий: шт. SO-1 и шт. SO-2, соответственно. Основные физиологические свойства шт. SO-2, выделенного из пульпы выщелачивания медного концентрата, представлены в ранее опубликованной работе [5].

Исследования показали, что при росте шт. SO-1 на твердой среде с тетрагидратом образуются регулярные колонии молочно-белого цвета, покрытые слоем слизи. Клетки бактерии представляют собой палочки размером 0,3-0,5 x 0,7-2,0 мкм (рис. 1), тогда как клетки шт. SO-2 по мере роста превращаются в длинные нити, иногда переплетенные между собой [5].

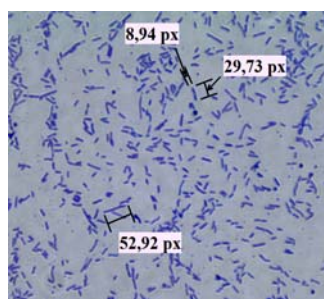


Рис. 1. Микрофотография окрашенных генциановым фиолетовым клеток шт. SO-1 (1пиксель (px) = 263,6 микрометр)

В качестве источника энергии бактерии могут использовать элементарную серу (S^0), а также тетрагидрат ($Na_2S_4O_6 \cdot 2H_2O$). На среде с элементарной серой через 5-7 сут. наблюдается интенсивный рост бактерии, увеличение оптической плотности среды и ее подкисление в результате активного образования серной кислоты.

Рост выделенных бактерий на среде с элементарной серой возможен в интервале 25-40°C. Оптимальная температура роста для шт. SO-1 – 35°C (рис. 2).

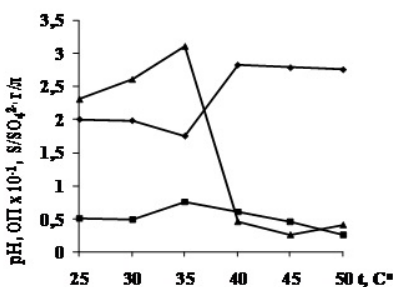


Рис. 2. Влияние температуры на рост бактерии шт. SO-1 и окисление элементарной серы (продолжительность – 9 сут.)
◆ - pH, ■ - оптическая плотность (ОП x 10⁻¹), ▲ - S/SO₄²⁻, г/л

Рост бактерий наблюдается в диапазоне pH 2,0-6,0. Максимальная скорость роста и окисления элементарной серы проявляется при pH 2,7-3,0 (рис.3).

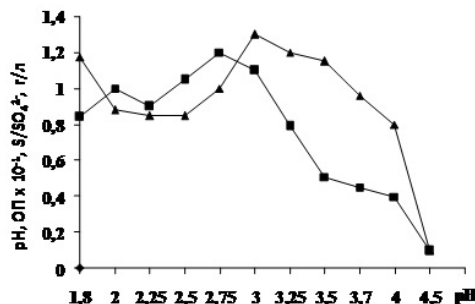


Рис. 3. Рост бактерии шт. SO-1 и окисление элементарной серы в зависимости от pH среды (продолжительность 10 сут.) — оптическая плотность (ОП × 10⁻³), — S/SO₄²⁻, г/л

Исследования показали, что дрожжевой экстракт в концентрации 0,005-0,01% в среде стимулирует рост бактерий и окисление ими элементарной серы. Дальнейшее повышение концентрации дрожжевого экстракта подавляет рост бактерий и окислительные процессы (рис. 4).

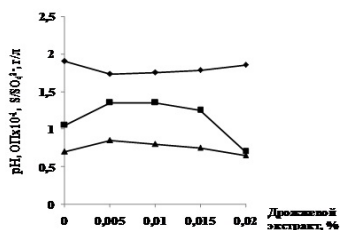


Рис. 4. Влияние концентрации дрожжевого экстракта на рост шт. SO-1 и окисление элементарной серы (продолжительность — 10 сут.)

◆ — pH, — оптическая плотность (ОП × 10⁻³), — S/SO₄²⁻, г/л

Полученные результаты позволяют заключить, что выделенный шт. SO-1 является факультативным хемолитоавтотрофом, который получает энергию для своей жизнедеятельности в процессе окисления неорганических веществ, в частности восстановленных соединений серы, при этом фиксируя углекислоту атмосферы или используя органические источники углерода.

Филогенетический анализ. Идентификация выделенных штаммов, входящих в состав микробной ассоциации при выщелачивании цинкового и медного концентратов, была осуществлена путем анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рПНК.

Анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рПНК. Для исследуемых шт. SO-1 и шт. SO-2 была определена практически полная последовательность (1480 и 1478 нуклеотидов соответственно) амплификата гена, кодирующего 16S рПНК, что соответствует позициям с 20 по 1505 и с 19 по 1502 по номенклатуре *E. coli*.

Предварительный скрининг по базе данных GenBank выполнен при использовании BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) [9].

Из полученных данных следует, что филогенетически наиболее близкими к нуклеотидным последовательностям 16S рПНК исследованных штаммов SO-1 и SO-2

ЛИТЕРАТУРА

1. Булыгина Е.С., Кузнецов Б.Б., Марусина А.И., Кравченко И.К., Быкова С.А., Колганова Т.В., Гальченко В.Ф. Изучение нуклеотидных последовательностей *lipA* генов у представителей метанотрофных бактерий. Микробиология, 71, 4, с.500-508, 2002.
2. Варданын Н.С., Варданын А.К. Селективное извлечение металлов из цинкового концентрата ассоциацией хемолитотрофных бактерий. Прикл. биохимия и микробиология, 47, 5, с.566 -571, 2011.
3. Герхардт Ф. и др., Методы общей бактериологии: в 3т. М., Мир, 1, 1983.
4. Каравайко Г.И., Кузнецов С.И., Голомзик А.И. Роль микроорганизмов в выщелачивании металлов из руд. М., Наука, 248 с., 1972.
5. Нагдалян С.З., Кочарян Е. М., Варданын Н.С. Особенности сообщества хемолитотрофных бактерий при выщелачивании медного концентрата. Биолог. журн. Армении, 61, 1, с.18-23, 2009.
6. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology /Eds. Staley J.T., Bryant M.P., Pfenning N., Holt J.G./, 3, p.1842- 1853, 1989.
7. Birnboim H.C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res., 7, 6, p.1513-1523, 1979.
8. Bryant R.D., McGroarty K.M., Costerton J.W. Isolation and characterization of a new acidophilic *Thiobacillus* species (*T.albertis*). Canad. J. Microbiol, 23, 9, p.1159-1170, 1983.
9. Camacho C., Coulouris G., Avagyan V., Ma N., Papadopoulos J., Bealer K., Madden T. L., BLAST: architecture and applications. BMC Bioinformatics, Dec. 15; 10, 421, 2009.
10. Coram, N.J. and Rawlings, D.E. Molecular relationship between two groups of *Leptospirillum* and the finding that *Leptospirillum ferriphilum* sp. nov. dominates South African commercial biooxidation tanks which operate at 40°C. Appl. Environ. Microbiol., 68, p.838-845, 2002.
11. Dodgson R.S. Biochem.J. Determination of Inorganic Sulphate in Studies on the Enzymic and non-enzymic Hydrolysis of Carbohydrate and Other Sulphate Esters, 78, p.312-319, 1961.
12. Dopson M., Lindstrom E.B. Potential role of *Thiobacillus caldus* in Arsenopyrite Leaching. Appl. Environ. Microbiol., 65, 1, p.36-40, 1999.
13. Dopson M., Lindstrom E.B. Analysis of Community Composition during Moderately Thermophilic Bioleaching of Pyrite, Arsenical pyrite, and Chalcopyrite. Microbial Ecology, 48, 1, p.19-28, 2004.
14. Goebel B.M., Stackebrandt E. Cultural and phylogenetic analysis of mixed microbial populations found in natural and commercial bioleaching environments. Appl. Environ. Microbiol., 60, p.1614-1621, 1994.
15. Hallberg, K.B. and Lindström, E.B. Characterization of *Thiobacillus caldus* sp. nov., a moderately thermophilic acidophile. Microbiology, 140, 3451-3456, 1994.
16. Hallberg, K.B. and Johnson, D.B. Biodiversity of acidophilic prokaryotes. Adv. Appl. Microbiol. 49, 37-84, 2001.
17. Kelly D.P., Wood A.P. Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 50, p.511-516, 2000.
18. Laishly E.J., Rae K., Dillman A.M., Bryant R.D., Characterization of a new acidophilic *Thiobacillus* isolate (*Thiobacillus capsulatus*). Canad. J. Microbiol. 34, p.960-966, 1988.
19. Lane D.J. 16S/23S sequencing. In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Stackebrandt E. a. Goodfellow M. (Eds.). Chichester: John Wiley & Sons, Ltd., p.115-175, 1991.
20. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, p.5463-5467, 1977.

Поступила 11.06.2012



Biolog. Journal of Armenia, 1 (65), 2013

USE OF DATE-PALM WASTES AS A SUBSTRATE ON TOMATO YIELD AND NUMBER

M. SHIRANI

Department of Soil Science, Faculty of Agriculture,
Armenian National Agrarian University
shirani.marjan@yahoo.com

Some problems in soil culture (such as salinity and unsuitable soil characteristics) in many countries, especially in Iran, have expanded soilless culture. The aim of this study was the using of Date-Palm waste as a substrate on tomato yield and number. The research was conducted in a completely block randomized design with 4 replications in three experiments. The treatments were three composting time (t) and three particle sizes included: A= (0-0.5 cm) –t (0), B= (0-0.5 cm) –t (3), C= (0-0.5 cm) –t (6), D= (0.5-1 cm) – t (0), E= (0.5-1 cm) –t (3), F= (0.5-1 cm) –t (6), G= (1-2 cm) -t (0), H= (1-2 cm) –t (3), I= (1-2 cm) – t (6). Papadopolus formula was used for nutrient solution during tomato growth with fertigation method. In experiments 1, 2 and 3 amounts of irrigation were 3 liters, 2.4 liters and 1.8 liters respectively. Also temperature and humidity were constant for all treatments. Comparison of means showed that the treatments had significant effect on yield and number of tomato fruit in three experiments. The results showed that date-palm peat is an appropriate media for soilless culture, also date palm peat with medium size (0.5-1cm) and more composting time (6 months) was more suitable for cultivation and increase yield of fruit.

Soilless culture – composting time – palm waste – size fraction – tomato number – yield

Շատ երկրներում, հատկապես Իրանի հանրապետությունում, հողային կուլտուրաների որոշ խնդիրները (աղիություն, անպիտան հողային պայմաններ), ջրային ռեսուրսների սահմանափակ լինելը, առաջ են բերել բույսերի անհող աճեցման (հիդրոպոնիկա) անհրաժեշտությունը: Հետազոտման նպատակն է՝ ուսումնասիրել, որպես սննդամիջավայր օգտագործվող փյունիկյան արմավենու թափոնների ազդեցությունը տոմատի պտուղների քանակի և բերքատվության վրա: Հետազոտությունը իրականացնելու համար կատարվել է երեկ փորձ, պատահական ընտրանքի եղանակով, չորս կրկնողությամբ: Փորձի տարբերակները ընդգրկել են՝ կոմպոստացման երեք ժամանակաշրջան (t) և ֆրակցիոն մասնիկների երեք տարբեր չափ՝ A = (0-0.5 սմ), t (0), B = (0-0.5 սմ), t (3), C = (0-0.5 սմ) -t (6), D = (0.5-1 սմ) - t (0), E = (0.5-1 սմ), t (3), F = (0.5-1 սմ), t (6), G = (1-2 սմ) - t (0), H = (1-2 սմ) - t (3), I = (1-2 սմ) - t (6): Ֆերտիգացիայի եղանակով բույսերի աճեցման ընթացքում սննդարար լուծույթի պատրաստման համար օգտագործվել է Պապադոպոլուսի բանաձևը: Առաջին, երկրորդ և երրորդ փորձերի ընթացքում ռոռզման ծավալները համապատասխանաբար կազմել են 3 լիտր (T), 2.4 լիտր (80% T) և 1.8 լիտր (60% T): Ջերմաստիճանը, օդի հարաբերական խոնավությունը և ռոռզման չափը բոլոր տարբերակների համար եղել է նույնը: Ստացված արդյունքները ցույց են տալիս, որ փյունիկյան արմավենու թափոնները համապատասխան միջավայր են հանդիսանում անհող աճեցման (հիդրոպոն) կուլտուրաների աճեցման համար: Տոմատի պտուղների աճեցման, նաև քանակի և բերքատվության ավելացման համար, լավագույն արդյունքներ են ստացվել ֆրակցիոն մասնիկների միջին չափ (0.5-1 սմ) և 6 ամիս կոմպոստացման ժամանակաշրջան ունեցող փյունիկյան արմավենու թափոնների օգտագործման դեպքում:

Հիդրոպոնիկա կոմպոստացման ժամանակաշրջան – փյունիկյան արմավենու թափոնների ծառեր – մասնիկների չափերի – տոմատի պտուղների քանակի – բերքատվություն

Некоторые проблемы почвенных культур (соленость и непригодные почвенные особенности) и ограниченность водных ресурсов во многих странах, особенно в Иране, вызвали необходимость выращивания гидропонных культур. Целью данного исследования является изучение влияния размера фракционных частиц и времени компостирования отходов финиковых пальм на урожайность и количество плодов томата. Опыты проводились методом случайной выборки с тремя вариантами и в четырех повторностях. Варианты опыта включали три времени компостирования (t) и три размера фракционных частиц: A = (0-0.5 см) - t (0), B = (0-0.5 см) - t (3), C = (0-0.5 см) - t (6), D = (0.5 - 1 см) - t (0), E = (0.5-1 см) - t (3), F = (0.5-1 см) - t (6), G = (1-2 см) - t (0), H = (1-2 см) - t (3), I = (1-2 см) - t (6). Для приготовления питательного раствора в процессе выращивания растений методом фертигации была использована формула Пападополуса. Нормы полива в опытах 1, 2 и 3 составляли соответственно 3 л (Т), 2,4 л (80% Т) и 1,8 л (60% Т). Температура и относительная влажность воздуха для всех вариантов опыта была одинаковой. Сравнение полученных данных показало, что во всех трех вариантах опыта наличие данного субстрата оказывает существенное влияние на урожайность и количество плодов томата. Отходы финиковых пальм со средним размером фракционных частиц (0,5-1 см) 6-ю месяцами времени компостирования являются более подходящим субстратом для выращивания и повышения урожайности и количества плодов томата.

Беспочвенная культура – время компостирования – отходы финиковых пальм – размеры фракционных частиц – количество плодов томата – урожайность

Tomato is commonly produced as an early spring crop or out-of-season in open field, glasshouse or polyethylene tunnel. Pests and diseases in soil culture have always created problems, especially in protected areas. (Gul et al., 2005) Today, in many countries, soilless culture techniques are used for production, especially in greenhouses (Çlikel, 1999). The choice of substrates for soilless cultivation represents one of the key points to be considered (Leonardi, 2006) due to technical and economical implications (Giuffrida et al., 2008). Samiei et al. (2005) investigated the effect of peat moss, coco peat and date-palm wastes as substrates on the growth of *Aglaonema*, and their results showed that date-palm peat would be a proper substitute in the future. Also Borji et al (2010) showed that date-palm peat is an appropriate media for soilless culture with suitable physical and chemical properties, availability and low cost. Therefore it can be new substrates that introduce for replacing with other media. The date palm (*Phoenix dactylifera*) is one of the important palm productions in the gardens of Iran. Based on published statistics, more than 180,000 ha of the country's lands are under the cultivation of date palm, and many provinces of the country, especially southern provinces, grow it. Recently, most of the residuals of the palm grove were burnt. In some areas, the date palm leaves are used for making shade, alcove, break wind, and as a cover for new planted saplings of fruit trees like date palm tree. Date palm peat is the waste and residual of date palm tree (Mohammadi et al., 2011). The aim of this study was the using of Date-Palm waste as a substrate on fruit tomato yield and number.

Materials and methods. This study was performed in the greenhouse research site of Azad Isfahan University (Khorasgan) in a completely randomized block design with 9 treatments and 4 replications in three experiments. Palm wastes were chopped into smaller sizes by combine and chopped wastes are separated in three sizes (<0.5, 0.5-1 and 1-2 cm) by sieve. Then, they were kept in 1.5 m³ plastic bags for controlling the moisture and temperature. Some amounts of animal fertilizer, N and P fertilizers were added to them as a fermentation starter and these bags were placed in hot (25 to 30°C) condition. For respiration, some air holes were made on the bags and the moisture was adjusted to 65%. Every week, these materials were mixed together and put into the bags again (During the 3 and 6 months). The treatments were three composting time (t) and three particle sizes included: A= (0-0.5 cm) -t (0), B= (0-0.5 cm) -t (3), C= (0-0.5 cm) -t (6), D=

(0.5-1 cm) – t (0), E= (0.5-1 cm) –t (3), F= (0.5-1 cm) –t (6), G= (1-2 cm) –t (0), H= (1-2 cm) –t (3), I= (1-2 cm) –t (6). Then, these palm wastes dumped into Ten-liter pots and then 4 holes were created on the bottom of pots as drain. Tomato seeds were planted in coco peat and after 30 days, transplanting of tomatoes was transferred into the pots. Irrigation was done according to papadopolous nutrient solution during eight months. Also temperature and humidity were constant for all treatments. In experiments 1, 2 and 3, amounts of irrigation were 3liters, 2.4 liters and 1.8 liters respectively by hand. The plants were 108 totally. Substrates leaching were performed every fifteen days for prevention of salt accumulation in the substrates. Electrical conductivity (EC), pH and porosity of substrates were measured by Verdonck and Gabriels (1992) methods. Cation exchange capacity (CEC) (Rhoades, 1982) and carbon to nitrogen ratio (C/N) (Walkley and Black, 1934) were determined. Fruit number was counted and yield was measured by digital scale. Analysis of variance of data was done with SAS software. Average Comparison of data was done by Duncan method (5%).

Tab. 1. Selected physiochemical properties of treatments (culture media)

T	PH	EC, ds/m	CEC, cmol/kg	Porosity, %	C/N, %
A	6.84	6.29	38.85	83	37.88
B	6.72	5.68	47.49	88	29.85
C	6.91	5.99	59.11	87	25.43
D	6.74	3.91	28.84	89	40.83
E	6.62	4.42	36.26	88	33.56
F	6.86	4.62	38.3	87	28.2
G	6.69	3.41	18.22	90	43.67
H	6.54	3.8	28.99	89	30.76
I	6.82	4.97	34.95	88	23.68

Results and Discussion. Tab. 2 shows the effect of different treatments on number and yield of tomato fruit in experiment 1. Maximum amount of fruit number was observed in D treatment although it didn't have significant difference with F treatment at level % 5. Treatment F significantly ($P < 0.05$) increased yield of tomato fruit.

Tab. 2. Effect of different treatments on number and yield of tomato in experiment 1.

Treatment	Number	Yield (kg)
A	73.5±6.2ab	9.68±0.82ab
B	76.5±4.5ab	7.78±2.05b
C	69±5.48ab	9.83±0.84ab
D	80.25±6.24a	8.75±2b
E	74.75±4.92ab	9.78±2.16ab
F	74.76±8.49ab	12.12±2.05a
G	66.75±11.7b	7.453±1.06b
H	65.25±7.41b	7.14±2.16b
I	67.25±7.2ab	8.923±0.79b
MSE	7.82	1.62

Tab. 3 shows the effects of different treatments on number and yield of tomato in experiment 2. Treatment B had the highest yield of tomato although it didn't have significant difference with F treatment at level % 5. Highest amount of fruit number were in treatments G and A.

Tab. 3. Effect of different treatments on number and yield of tomato in experiment 2

Treatment	Number	Yield (kg)
A	84.25±11.38a	8.48±0.44ab
B	49.5±11.91b	10±1.13a
C	65.5±11.12ab	7.88±1.73ab
D	68.5±11.9ab	8.59±1.56ab
E	75.5±7.14ab	7.24±1.51ab
F	69.5±7.14ab	9.9±1.13ab
G	80.25±7.14a	9.88±1.4ab
H	67.25±8.73ab	8.27±1.49ab
I	54.5±6.03b	7.2±1.23b
MSE	12.82	1.66

Effects of different treatments on number and yield of tomato in experiment 3 are shown in tab. 4. The highest number and yield of tomato were observed in treatment F. C/N ratio in water extract could serve as a reliable indicator of compost maturity (Chanyasak et al., 1983) and in a mature compost C/N ratio is less than or equal to 25 (Schuchardt, 2005). Therefore culture media I can be mature compost and culture medias C and F were near the mature compost. It shows in these culture medias biological activity has been decreased and required nutrients are present in adequate amounts for plant growth.

Tab. 4. Effect of different treatments on number and yield of tomato in experiment 3

Treatment	Number	Yield (kg)
A	77±8.98ab	8.57±85b
B	70.5±3.87abcd	7.99±0.9bc
C	64.5±5.98bcd	7.8±0.52bc
D	74.25±13.05abc	8.98±2.47ab
E	58.75±2.63d	6.03±0.49c
F	83±8.76a	11.1±1.34a
G	73.25±10.53abc	9.08±2.42ab
H	64.5±5.98bcd	7.45±0.33bc
I	74.75±5.25abc	8.21±0.9bc
MSE	7.82	1.47

Mature compost gives plants an advantage in increased nutrients and water availability, and reduces disease pressures (Christian et al., 2009). Therefore treatment F significantly increased fruit yield in three experiments. Mohammadi et al. (2011) reported tomato fruit yield and number in date palm and perlite media had no significant difference at 5% level. Tzortzakis and Economakis (2008) represented that higher yield of tomato fruits was obtained from plants grown in organic media as compared with inorganic media. Borji et al. (2012) showed that culture medias including composted palm peat, un-composted palm peat had no significant difference in fruit and number of tomato fruits. Mohammadi et al. (2012) investigated the comparison of Date-Palm wastes and Perlite as culture substrates on growing indices in greenhouse cucumber and reported that Perlite and Date-Palm waste media had similar properties and they had no significant difference on yield and number of cucumber fruit. Hematian et al. (2012) investigated the effect of addition of some organic waste to soil on yield and some growth indices of greenhouse cucumber and reported higher yield were obtained from pure palm peat media. Comparison of means showed that the treatments had significant effect on yield and number of tomato fruit in 3 experiments. In experiment #1, maximum

amount of fruit number was observed in treatment D although it didn't have significant difference with treatment F at level %5 and treatment F significantly ($P < 0.05$) increased yield of tomato fruit. In experiment #2, treatment B had the highest yield of tomato although it didn't have significant difference with treatment F at level %5. Highest amount of fruit number were in treatment G and A in experiment 2. In experiment #3, the highest number and yield of tomato were observed in treatment F. The results showed in three experiments treatment F were better in other treatment with regard to its substrate properties and its yield.

REFERENCES

1. *Borji H., A. Ghehsareh, M. Jafarpour.* A comparison between tomato quality of mature-green and red-ripe stages in soilless culture. *African Journal of Agricultural Research*, 7, 10, pp. 1601-1603, 2012.
2. *Chanyasak V, Katayama A, Hirai M, Mori S, Kubota H.* Effects of compost maturity on growth of Komatsuna (*Brassica Rapa* var. *Pervidis*) in Neubauer's pot. II. Growth inhibitory factors and assessment of degree of maturity by org-C/org-N ratio of water extracts. *Soil Science and Plant Nutrition* 29, 3, 251-259, 1983.
3. *Celikel G.* Effect of different substrates on yield and quality of tomato. *Acta Hort.*, 486, 353-357, 1999.
4. *Christian A.H., G.K. Evanylo, R. Green,* Compost: What Is It and What's It To You. Virginia State University Publication, 452-231, 2009.
5. *Giuffrida F., C. Leonardi, O. Marfà.* Substrate reuse in tomato soilless cultivation. *Acta Hort.*, p. 801, ISHS, 2008, 2008.
6. *Gul A., E. Deniz, R.O. Ali.* Comparison of the use of zeolite and perlite as substrate for crisp-head lettuce. *Scientia Horticulturae*, 1 November 2005, 106, 4, 464-471, 2005.
7. *Hematian M, Mohammadi Ghesareh A, Kalbasi M.* Effect of addition of some organic waste to soil on yield and some growth indices of greenhouse cucumber. The 1th International and The 4th National Congress on Recycling of Organic Waste in Agriculture, 2012.
8. *Mohammadi A., N. Samadi, and H. Borji.* Comparison of date-palm wastes and perlite as growth substrates on some tomato growing indexes. *African Journal of Biotechnology* 24, 10, 4871-4878, 2011.
9. *Mohammadi Ghehsareh A, Hematian M, Kalbasi M.* Comparison of Date-Palm wastes and Perlite as culture substrates on growing indices in greenhouse cucumber. The 1th International and The 4th National Congress on Recycling of Organic Waste in Agriculture, 2012.
10. *Rhoades J.D.* Cation exchange capacity. In 'Methods of soil analysis'. (A.L. Page ed.) pp. 149-157. (Agron. No. 9, Part2: Chemical and mineralogical properties, Am. Soc. Agron., Madison, WI, USA), 1982.
11. *Samiei L., A. KHalighi, M. Kafi, S. Samavat and M. Arghavani.* An investigation of substitution of peat moss with palm tree celluloid wastes in growing aglaonema (*Aglaonema Commutatum* Cv. Silver Queen). *Iranian Journal Agriculture Science* 36, 2, 503-510, 2005.
12. *Schuchardt F.* Composting of Organic Waste. *Environmental Biotechnology, Concepts and Applications*, Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2005.
13. *Tzortzakos N., Economakis G.CD* Impacts of the substrate medium on tomato yield and fruit quality. *Hort. Sci.* 2, 83-89, 2008.
14. *Verdonck O, Vleeschauwer D, De Boodt M.* The influence of the substrate to plant growth. *Acta Hort.* (ISHS), 126: 251-258, 1982.
15. *Walkley A., Black I.A.* An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci.* 37, 29-38, 1934.

Received 12.12.2012



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 1(65), 2013

ՌԱԴԻՈՆՈՒԿԼԻԴՆԵՐԻ ԿՈՒՏԱԿՈՒՄԸ ՄԵՂՐԱԽՈՏԻ (STEVIA
REBAUDIANA BERTONI) ԲՈՒՍԱՀՈՒՄՔՈՒՄ ԱՐԱՐԱՏՑԱՆ ԴԱՇՏԻ
ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ

Մ.Ա. ԲԱԲԱՆԱՆՅԱՆ, Լ.Մ.ՂԱԼԱՉՅԱՆ, Լ.Է.ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ

ՀՀ ԳԱԱ Գ.Ս. Դավթյանի անվան հիդրոպոնիկայի պրոբլեմների ինստիտուտ
hydrop@netsys.am

Ուսումնասիրվել են արհեստական (^{137}Cs , ^{90}Sr) և բնական (U) ռադիոնուկլիդների (ՌՆ) կուտակման առանձնահատկությունները հողի և հիդրոպոնիկայի պայմաններում մշակված մեղրախոտի (*Stevia rebaudiana* Bertoni) բույսերում: Պարզվել է, որ բացօթյա հիդրոպոնիկայի պայմաններում աճեցված մեղրախոտի բուսահումքը էկոլոգիապես ավելի մաքուր է, քան հողայինը: Հիդրոպոնիկայի և հողի պայմաններում մշակված մեղրախոտում վերահսկվող արհեստական ՌՆ-ի (^{137}Cs , ^{90}Sr) պարունակությունը չի գերազանցել ՍԹՆ-ն:

Մեղրախոտ – հիդրոպոնիկա – հող – արհեստական, բնական ռադիոնուկլիդներ

Изучали особенности накопления искусственных (^{137}Cs , ^{90}Sr) и естественных (U) радионуклидов (РН) в растениях медовой травы (*Stevia rebaudiana* Bertoni), выращенных в условиях почвы и гидропоники. Выяснилось, что растительное сырье медовой травы, культивированное в условиях открытой гидропоники, экологически более чистое, чем почвенное. Содержание контролируемых искусственных РН (^{137}Cs , ^{90}Sr) в медовой траве, культивированной в условиях гидропоники и почвы, не превышало ПДК.

Медовая трава – гидропоника – почва – естественные, искусственные радионуклиды

Accumulation peculiarities of artificial (^{137}Cs , ^{90}Sr) and natural (U) radionuclides (RN) in *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bertoni), grown in hydroponics and soils near G.S. Davtyan Institute of Hydroponics Problems have been studied. It turned out that the raw material of *Stevia*, cultivated in open-air hydroponics was clearer than the soil variant. The content of controlled artificial RN (^{137}Cs , ^{90}Sr) in *Stevia* cultivated in soil and in hydroponics conditions hasn't exceeded the MACL.

Stevia – hydroponics – soil – natural, artificial radionuclides

Ժամանակակից աշխարհում միջավայրի աղտոտվածության անընդհատ աճող ֆոնի վրա դիտարկվում է նյութափոխանակության խանգարումով տառապող մարդկանց թվի կտրուկ աճ, նկատելիորեն փոքրանում է այդպիսի հիվանդությունների տարիքային շերտը: Նյութափոխանակության տարատեսակ խանգարումները, սննդային ալերգիաները, շաքարախտը ներկայումս պատկանում են մանկական հիվանդությունների շարքին: Դրությունը սաստկանում է նրանով, որ մարդը զարգացած երկրներում զրկված է թարմ, բնական սննդամթերքից օգտվելու հնարավորությունից: Տարեցտարի օրվա սննդաբաժնում աճում է մթերքների, կիսաֆաբրիկատների տեխնոլոգիական վերամշակման ենթարկված չափաբաժինը՝ արհեստական կոնսերվանտների և քաղցրեղենի օգտագործմամբ: Հնարավոր վտանգի խմբի մարդկանց և հիվանդների դիետիկ սնունդը հեշտացնելու, ինչպես նաև սնման կոպտության բարձրացնելու համար շատ երկրներում բնական դիաբետիկ քաղցրավենիքի և կոնսերվանտների որոնումներ են տարվում:

Այդ խնդրի լուծումը հնարավոր է նաև արտադրության մեջ նոր, բազմաբնույթ բույսերի ներմուծմամբ, որոնք հանդիսանում են արժեքավոր կենսաբանական ակտիվ նյութերի արտադրողներ: Այդպիսի բույսերի մեջ հեռանկարային է մեդրախոտը, որի տերևները պարունակում են ցածր կալորիականությամբ շաքարից 200-300 անգամ քաղցր փոխարինիչներ՝ ստեվիոզիդ և ռեբաուդիոզիդ: Մեդրախոտի անմշակ տերևները 30-50 անգամ ավելի քաղցր են շաքարից [8, 9, 11]: Ներկայումս շրջակա միջավայրն աղտոտող գործոններից մեծ վտանգ է ներկայացնում ռադիացիոն գործոնը, որի էկոլոգիական նշանակությունը սրվում է կապված ատոմային էներգետիկայի բնագավառում մարդու տեխնածին գործունեության հետ: Հատկապես վտանգավոր է կենսատերկրաքիմիական փոխանցման շղթայի միջոցով ռադիոնուկլիդների (ՌՆ) կուտակումը մշակաբույսերում, ինչի պատճառով դրանք թափանցում են մարդու օրգանիզմ՝ հանգեցնելով տարբեր հիվանդությունների առաջացմանը [5, 6, 10]: Այս առումով, որոշակի հետաքրքրություն է ներկայացնում մարդու առողջության համար վտանգավոր արհեստական ՌՆ-ից ^{90}Sr -ի ($T_{1/2} = 28,6$ տարի), ^{137}Cs -ի ($T_{1/2} = 30,1$ տարի) և բնական ՌՆ-ից U -ի տեղաշարժի և կուտակման առանձնահատկությունների ուսումնասիրումը բացօթյա հիդրոպոնիկայի և հողային պայմաններում մշակված մեդրախոտի բուսահումքում:

Նյութ և մեթոդ: Գիտափորձերը դրվել են 2009-2011թթ. Հայկական ԱԷԿ-ի (շահագործվել է 1976-1989թթ., վերաշահագործվել է 1995թ.) տեխնածին ազդեցության 30 կմ շառավիղով գոտում գտնվող ՀՀ ԳԱԱ Հիդրոպոնիկայի պրոբլեմների ինստիտուտում (ՀՊԻ): ՀՊԻ-ի փորձադաշտերը տեղակայված են Երևանի հարավ-արևելյան մասում, ծովի մակերևույթից մոտ 950 մ բարձրության վրա, Արարատյան դաշտի բնակլիմայական պայմաններում: Կլիման խիստ ցամաքային է, օդի ամսական միջին ջերմաստիճանը հուլիս-օգոստոս ամիսներին $25-26^{\circ}\text{C}$ է, տեղումների տարեկան միջին գումարը հասնում է մինչև 300 մմ: Հետազոտությունների համար օբյեկտ է ծառայել մեդրախոտը՝ *Stevia rebaudiana* Bertoni (նկ.1): Բույսերը տնկարկվել են 1 մ², 5 մ² սնման մակերես ունեցող հիդրոպոնիկական վեգետացիոն անոթներում և 1 մ² մակերեսով հողային ստուգիչում:



Նկ.1. Մեդրախոտը հիդրոպոնիկական վեգետացիոն անոթում

Ստուգիչի հողը կիսաանապատային է, ջրովի, կարբոնատային: Հումուսի պարունակությունը 9 % է, ապահովված է ֆոսֆորով և կալիումով: Հողը ոռոգվել է ՀՊԻ-ի տարածքով հոսող առվի (Հրազդան գետ) ջրով: Հիդրոպոնիկայում բույսերը սնուցվել են Գ.Ս. Դավթյանի կողմից առաջարկված սննդալուծույթով [1]: Որպես լցանյութ օգտագործվել է 3-15 մմ մասնիկների տրամագծով գլաքար, հրաբխային կարմիր և սև խարամ և դրանց խառնուրդը՝ 1:1 հարաբերությամբ: Փորձանմուշներում ^{90}Sr -ի, ^{137}Cs -ի պարունակությունը որոշվել է ռադիոքիմիական մեթոդներով՝ փոքր ֆոնային ՅՄՓ-1500 ռադիոմետրի միջոցով [4]: Ս-ը որոշվել է էքստրակցիոն ֆոտոմետրիկ եղանակով՝ արսենազո III ռեագենտի կիրառմամբ [7]: Ստացված տվյալները համեմատվել են սահմանաթույլատրելի խտությունների (ՍԹԽ) հետ [2, 3]:

Արդյունքներ և քննարկում: Բուսահումքի որակը բնութագրող կարևոր ցուցանիշ է արհեստական ՌՆ-ի պարունակության համապատասխանությունը ընդունված ռադիոէկոլոգիական անվտանգության չափանիշներին: Աղ.1-ում ներկայացված տվյալները ցույց են տալիս, որ բույսերի մշակման տարբեր եղանակները (հող, հիդրոպոնիկա) որոշ ազդեցություն են ունեցել բուսահումքում ՌՆ-ի կուտակման վրա: Ընդ որում, հիդրոպոնիկ բույսերը ռադիոակտիվության ցուցանիշներով զիջում են հողայիններին՝ հիդրոպոնիկայում բույսերի մշակման պայմանների ռադիոէկոլոգիական լարվածության թուլացման շնորհիվ:

Աղ.1. Ռադիոնուկլիդների պարունակությունը մեղրախոտի բուսահումքում հիդրոպոնիկայի և հողի պայմաններում

Կարելի է հողում, և	Մշակման եղանակը	U-10 ⁻⁶ %	⁹⁰ Sr	¹³⁷ Cs
			Բք/կգ	
	Հող	1,8	18,6	18,4
	Հիդրոպոնիկա	1,3	14,1	14,4
	Սթխ [2, 3]	-	100	400

հիդրոպոնիկայում բույսերի վերգետնյա օրգանների մեջ ՌՆ-ի արտարմատային ներթափանցման ընդհանուր սկզբնաղբյուր են ծառայել օդային ավազանից թափված մթնոլորտային տեղումները, փոշին, մուրը, անբոգոլերը: Հիդրոպոնիկայում բույսերի մեջ ՌՆ-ի թափանցման աղբյուր են ծառայել նաև սննդալուծույթի պատրաստման համար օգտագործված ելային արտեզյան ջուրը և քիմիական նյութերը, իսկ հողային պայմաններում՝ ոռոգիչ ջուրը և հողը (աղ. 2):

Աղ.2. Ռադիոնուկլիդների պարունակությունը ՀՊԲ-ի ջրջակա հողերում, ոռոգիչ, արտեզյան ջրերում և սննդարար լուծույթում

Նմուշի տեսակը	⁹⁰ Sr	¹³⁷ Cs	U-10 ⁻⁶ %
	Բք/կգ, Բք/լ		
Հող (0-30 սմ)	6,5	7,6	3,7
Ոռոգիչ ջուր (Հրազդան գետ)	0,064	0,009	0,02
Արտեզյան ջուր	0,044	0,007	հետքեր
Սննդարար լուծույթ	0,15	0,025	0,19
Մթն, խմելու ջրի համար [2, 3]	5,0	11,0	-

Պարզվել է, որ հողում մշակված մեղրախոտը, ինչպես արհեստական, այնպես էլ բնական ՌՆ-ի պարունակությամբ գերազանցել է հիդրոպոնիկայում մշակվածին համապատասխանաբար, 1,3 և 1,4 անգամ: Ըստ երևույթին, այստեղ որոշակի դեր են խաղացել ՀՊԲ-ի տարածքի մեղրախոտի մշակության համար օգտագործված ոռոգիչ ջրի և հողի համեմատաբար բարձր ռադիոակտիվությունը հիդրոպոնիկայում օգտագործվող սննդա-լուծույթի համեմատ: Աղյուսակ 2-ի տվյալները ցույց են տալիս, որ առվի ջուրը (Հրազդան գետ), որով ոռոգվել է հողը, ⁹⁰Sr-ի և ¹³⁷Cs-ի պարունակությամբ գերազանցում է սննդա-լուծույթի պատրաստման համար օգտագործված ելային արտեզյան ջրին, համապատասխանաբար, 1,4; 1,3 անգամ:

Հիդրոպոնիկայում մեղրախոտի մշակության համար օգտագործված ելային սննդալուծույթն ինչպես արհեստական (⁹⁰Sr-ը 3,4 անգամ, ¹³⁷Cs-ը 3,6 անգամ), այնպես էլ բնական (U-ը 9,5 անգամ) ՌՆ-ի պարունակությամբ նույնպես գերազանցել է արտեզյան ջրին: Դրանից հետևում է, որ սննդալուծույթի պատրաստման համար օգտագործված քիմիական նյութերում առկա են եղել U-ի, ⁹⁰Sr-ի, ¹³⁷Cs-ի միացություններ: Բացահայտվել է նաև, որ բնական ջրերում ⁹⁰Sr-ի պարունակությունը գերազանցել է ¹³⁷Cs-ին, առվի ջրում 7,1 անգամ, արտեզյան ջրում 6,3 անգամ, մինչդեռ հողում տեղի է ունեցել հակառակը՝ ¹³⁷Cs-ը գերազանցել է ⁹⁰Sr-ին 1,2 անգամ: Թեև ելային սննդալուծույթում ⁹⁰Sr-ի պարունակությունը գերազանցել է ¹³⁷Cs-ին, իսկ հողում ¹³⁷Cs-ը գերազանցել է ⁹⁰Sr-ին, սակայն և հողում, և հիդրոպոնիկայում մեղրախոտի բուսահումքում ⁹⁰Sr-ի և ¹³⁷Cs-ի պարունակությունը զգալի չափով չի տարբերվում: Հավանաբար, դա պայմանավորված է մեղրախոտի կենսաբանական առանձնահատկություններով: Ըստ գրականության տվյալների, հող-բույս համակարգում ՌՆ-ի դիտվող հարաբերությունների ($\Gamma_{\text{Հ}} = \frac{{}^{90}\text{Sr}}{{}^{137}\text{Cs}}$ բույսում/ $\frac{{}^{90}\text{Sr}}{{}^{137}\text{Cs}}$ հողում) արժեքները փոփոխական են և կախված են բույսերի տեսակային առանձնահատկություններից [9]: Պարզվել է, որ մեղրախոտը հողից նախընտրել է ⁹⁰Sr-ը, ¹³⁷Cs-ի համեմատ, մինչդեռ հիդրոպոնիկայում տեղի է ունեցել հակառակը: Այդ մասին են վկայում հող-բույս և սննդարար լուծույթ-բույս համակարգերում մեղրախոտի համար ⁹⁰Sr-¹³⁷Cs գույգի $\Gamma_{\text{Հ}}$ -ի և կուտակման գործակիցների ($\Upsilon_{\text{Հ}} = \text{ՌՆ-ի պարունակությունը բույսում} / \text{ՌՆ-ի պարունակությունը հողում}$) արժեքները: Այսպես, մեղրախոտի համար հողում $\frac{{}^{90}\text{Sr}}{{}^{137}\text{Cs}}$ գույգի $\Gamma_{\text{Հ}} > 1$ – ⁹⁰Sr $\Upsilon_{\text{Հ}} > \frac{{}^{137}\text{Cs}}{{}^{90}\text{Sr}}$ $\Upsilon_{\text{Հ}}$, իսկ հիդրոպոնիկայում՝ $\Gamma_{\text{Հ}} < 1$ – ¹³⁷Cs $\Upsilon_{\text{Հ}} > \frac{{}^{90}\text{Sr}}{{}^{137}\text{Cs}}$ $\Upsilon_{\text{Հ}}$: Սա համընկնում է գրականության տվյալների հետ, համաձայն որի հողում ⁹⁰Sr-ը գտնվում է իոնափոխանակային, իսկ ¹³⁷Cs-ը՝ ոչ փոխանակային ձևով [10]:

Պարզվել է, որ մեղրախոտի գումարային (-ակտիվության մեջ ^{90}Sr -ի և ^{137}Cs -ի մասնաբաժինը միասին հոդում և հիդրոպոնիկայում կազմել է համապատասխանաբար, 8,4 % և 5,9 % (աղ. 3):

Ակնհայտ է, որ թեև հիդրոպոնիկայում աճեցված մեղրախոտը գումարային (-ակտիվությամբ գերազանցել է հողայինին, սակայն գումարային (-ակտիվության մեջ ^{90}Sr -ի և ^{137}Cs -ի մասնաբաժնով 1,4 անգամ զիջում է դրան: Կարելի է ենթադրել, որ մեղրախոտի գումարային (-ակտիվության մնացած մասնաբաժինը՝ հոդում (91,6%), հիդրոպոնիկայում (94,1%) կազմել են ուրիշ բնական (40 K, 234 Th, 231 Th և այլն) և արհեստական (^{89}Sr , ^{134}Cs , ^{141}Ce և այլն) (-ակտիվությամբ օժտված ՌՆ-ը: Դրանցից ամենամեծ (-ակտիվություն ունի 40K-ը [10]:

Աղ.3. Մեղրախոտի բուսահումքի գումարային (-ակտիվությունը և դրա մեջ ՌՆ-ի մասնաբաժինը

Բույսերի մշակման եղանակը	Գումարային (-ակտիվություն Բք/կգ	^{90}Sr	^{137}Cs	Ուրիշ ՌՆ
		մասնաբաժինը (-ակտիվության մեջ, %		
Հող	440	4,2	4,2	91,6
Հիդրոպոնիկա	480	2,9	3,0	94,1

Այսպիսով, մեր ուսումնասիրությունների արդյունքում բացահայտվել է, որ բացօթյա հիդրոպոնիկայում աճեցված մեղրախոտի բուսահումքն արհեստական (^{90}Sr , ^{137}Cs) և բնական (U) ՌՆ-ի պարունակությամբ ռադիոէկոլոգիապես ավելի մաքուր է, քան հողայինը: Արարատյան դաշտի պայմաններում ինչպես անհող, այնպես էլ հողային մշակույթներում մեղրախոտի բուսահումքում վերահսկվող արհեստական ՌՆ-ի (^{90}Sr , ^{137}Cs) պարունակությունը չի գերազանցել ՄԹԽ-ն:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. *Դավթյան Գ.Ս., Մայրապետյան Ս.Խ.* Վարդաբույր խորդենու անհող արտադրությունը, Երևան, էջ 18-21, 1976:
2. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов: Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы. СанПиН 2,3,2,1078-01.-М.: ФГУП “Интер-СЭН”, 168 с., 2002.
3. Нормы радиационной безопасности (НРБ): Гигиенические нормативы. М.: Центр санитарно-эпидемиологического нормирования гигиенической сертификации и экспертизы Минздрава России.М., 116 с., 1999.
4. *Павлоцкая Ф.И.* Методы определения ^{90}Sr и других изотопов. В книге: Физико-химические методы исследования почв. М., 126 с., 1966.
5. *Панов А.В., Фесенко С.В., Алексанхин Р.М., Пастернак А.Д., Прудников П.В., Санжарова Н.И., Горяинов В.А., Новиков А.А., Музалевская А.А.* Радиоэкологическая ситуация в сельскохозяйственной сфере на загрязненных территориях России в отдаленный период после аварии на Чернобыльской АЭС. Радиационная биология. Радиоэкология, 47, 4, с. 423-434, 2007.
6. *Перемитина Т.О., Полищук Ю.М., Несветайло В.Д.* Ретроспективный мониторинг радиоактивного загрязнения в зонах воздействия предприятий атомной промышленности. Радиационная биология. Радиоэкология. 47, 4, с. 444-450, 2007.
7. *Пристер Б.С., Зубач С.С.* Использование арсеназо-3 для определения урана в почвах и биологических объектах. Радиохимия, 10, выпуск 6, с. 743 -748, 1968.
8. *Оганесян Л.Э., Бабахянян М.А.* Интродукция стевии в условиях открытой гидропоники на Араратской равнине. Известия государственного аграрного университета Армении. Международная научная конференция, Ереван, 3, с. 53-56, 2010.
9. *Оганесян Л.Э., Бабахянян М.А.* Интродукция стевии ребаудиана в Армении. Материалы XIX Международного симпозиума “Нетрадиционное растениеводство. Селекция и генетика. Экология. Экология и здоровье”. Симферополь, с. 296, 2010.
10. Сельскохозяйственная радиоэкология. Под ред. Алексахина Р.М., Корнеева Н.А., М., Экология, 400 с., 1992.
11. *Семенова Н.А.* Стевия – растение XXI века. – СПб., изд-во “ДИЛЯ”, 160 с., 2004.

Ստացվել է 13.07.2012



Биол. журн. Армении, 1 (65), 2013

СИМБИОНТЫ АРАРАТСКОЙ КОШЕНИЛИ *PORPHYROPHORA HAMELII*
BRANDT
(HOMOPTERA, COCCINEA, MARGARODIDAE)

Л.П. МКРТЧЯН, С.Р. МАКАРЯН

Научный центр зоологии и гидроэкологии НАН РА
murmar07@gmail.com

Исследованы мицетомы с симбионтами араратской кошенили, их строение и локализация в теле насекомого. Симбионты в жизни насекомых выполняют в основном трофическую функцию. Ведутся исследования для выявления возможной роли их в процессе синтеза карминовой кислоты у араратской кошенили.

Кокциды – мицетомы – симбионты

Հետազոտվել են արարատյան որդան կարմիրի միցետոմները սիմբիոնտներով, նրանց կառուցվածքը և տեղայնացումը միջատի մարմնում: Սիմբիոնտները միջատների կյանքում հիմնականում կատարում են տրոֆիկ ֆունկցիա:

Հետազոտություններ են տարվում ի հայտ բերելու նրանց հավանական դերը կարմինաթթվի սինթեզման պրոցեսում արարատյան որդանի օրգանիզմում:

Coccinea – միցետոմներ – սիմբիոնտներ

Ararat cochineal mucetomas with symbionts as well as their structure and localisation in the insect organism were studied. Symbionts provide the trophic function for insects. To find out their probable rôle in carminic acid synthesis process in ararat cocheneal organism the investigations are carrying out.

Coccinea – mycetomas – symbionts

Симбионты играют важную роль в жизни насекомых, и роль эта связана, в первую очередь, с питанием организма, но она очень сложна и выяснена еще недостаточно.

Симбиотические организмы найдены у полужесткокрылых, питающихся соками растений, червецов, кровососущих. Локализуются они в полости кишечника, в специальных отростках передней кишки. Иногда они находятся внутри кишечных клеток, как у жуков точильщиков, личинок дровосеков – форм, связанных с древесиной. У некоторых жуков (долгоносики, листоеды) симбионты живут в клетках мальпигиевых сосудов. У многих насекомых симбионты находятся в жировом теле или половых железах.

Клетки, в которых обитают симбионты – мицетоциты, часто обособляются морфологически в мицетом. Мицетом и живущие в нем симбионты встречаются у всех особей данного вида, что существенно отличает это явление от паразитизма, так как паразиты всегда присутствуют у части особей хозяина. Симбионты передаются потомству через половые клетки. Этим объясняется их присутствие у всех

особей вида. Они проникают в яйцевые клетки еще в теле матери и автоматически оказываются в теле зародыша.

Следует отметить, что в большинстве случаев в теле насекомого находится один вид мицетомы, но нередко встречаются два вида, а иногда и более [9].

Большинство представителей Homoptera характеризуются наличием эндосимбионтов, снабжающих своих хозяев недостающими в соке проводящих сосудов белков и витаминов, которые восполняются в результате переработки продуктов их метаболизма и фиксации атмосферного азота. Вместе с этим симбионты выполняют и санитарную функцию [9].

Главными признаками, различающими симбионты кокцид, являются их природа (бактериеподобные или дрожжеподобные), расположение их в теле насекомого и способ заражения яйцеклетки.

По сочетанию этих особенностей выделяют типы симбиоза, распределение которых по семействам кокцид определяется эволюцией подотряда. Так, примитивные группы обладают бактериеподобными симбионтами, эволюционно более продвинутые – дрожжеподобными.

Наиболее вероятно, что мицетциты и свободно рассеянные симбионты присущи более продвинутым семействам кокцид, в отличие от более архаичного мицетомы. Кроме того, заражение яйцеклетки в примитивных семействах, в отличие от более продвинутых, идет через задний полюс [1].

Целью настоящего исследования являлось изучение симбионтов араратской кошенили – представителя карминоносных червецов и их роль в организме самки.

Материал и методика. Для выявления наличия симбионтов, расположения их в теле насекомого, свойств их и возможной роли в пигментообразовании производилось анатомо-топографическое исследование внутренних органов самки под микроскопом МБС-1. Нефиксированные препараты наблюдались также в фазово-контрастном микроскопе.

Учитывая, что при гистологической обработке кармин экстрагируется из пигментообразующих структур и закрашивает морфоструктуры, отпрепарированные половая и пищеварительная системы, их отделы и структуру фотографировали под микроскопом “Эргавал” в физиологическом растворе, гистопрепараты изучали под микроскопом NU-2E.

Для фиксации целых организмов, а также изолированной половой системы, отдельных ее частей и яиц использовали растворы Буэна, ФСУ (формалин – спирт – уксусная кислота, 3:1:0,3), смесь Петрункевича и раствор Карнуа.

С целью гистологического анализа отдельные части половой системы заливали в парафин. Срезы толщиной в 6-7 мкм окрашивали гематоксилином-эозином по Ганзену, железным гематоксилином – по Гейденгайну.

Результаты и обсуждение. Половая система половозрелых самок араратской кошенили, вышедших из цист на поверхность почвы с целью спаривания, занимает значительную часть брюшной полости. Она состоит из парных яичников, парных и непарного яйцеводов, вагины и сперматеки. Яичники состоят из двух длинных, извитых яйцевыводящих трубок, вокруг которых радиально расположены однокамерные яйцевые трубочки – овариолы разной степени развития [6]. На поверхности яйцевыводящих трубок в жировом теле были обнаружены парные образования неопределенной формы – мицетомы (рис. 1). Сходная картина яичников с мицетомой наблюдается у *Margarodes* [10].

К началу инцистирования личинок яичники представлены двумя протоками со множеством сферических выпячиваний – фолликул. Перед вступлением ооцитов в период роста яичники приобретают розовую окраску за счет появления пигмента – кармина в фолликулах (рис. 2).



Рис. 1. Схема половой и пищеварительной систем самки араратской кошенили. 1 – яичники; 2 – парные яйцеводы; 3 – непарный яйцевод; 4 – железистая часть вагины; 5 – свободный от желез участок вагины; 6 – сперматека; 7 – мицетомы

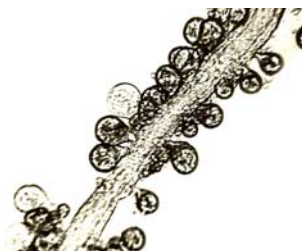


Рис. 2. Отрезок яичника личинки. Нативный препарат. Увел.: об. 10х; ок. 10х

В период вителлогенеза параллельно накоплению желтка в ооплазме в виде крупных гранул идет интенсивное увеличение числа более мелких гранул разных оттенков красного цвета. Перед выходом самок из цист в фолликулах яичника идет рост ооцитов и обособление питающих клеток в апикальной части каждого ооцита, в результате чего овариолы приобретают грибовидную форму. В плазме ооцитов продолжается накопление пигментных гранул, придающих им ярко-красную окраску (рис. 3) [4, 5]. Наряду с этим процессом идет и рост мицетома. При рассмотрении его под большим увеличением можно увидеть округлые клетки – мицетоциты (рис. 4), при разрыве которых освобождается масса мелких палочковидных образований – бактериевидных симбионтов (рис. 5) (неопубликованные данные Л. Мкртчян). Такие же образования были обнаружены у базального основания овариолы (рис. 6) [3].



Рис. 3. Отрезок яичника перед выходом самки из цисты. В плазме ооцитов наблюдается скопление пигментных гранул (стрелки). Нативный препарат. Увел.: об. 10х; ок. 10х

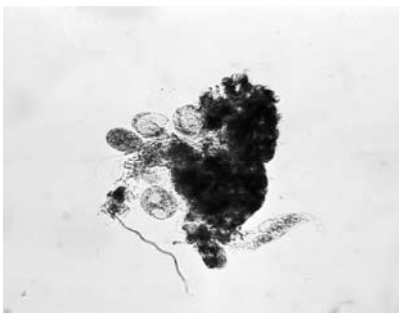


Рис. 4. Изолированный от яичников мицетом с мицетоцитами.
Нативный препарат. Увел. об. 20х; ок. 3х

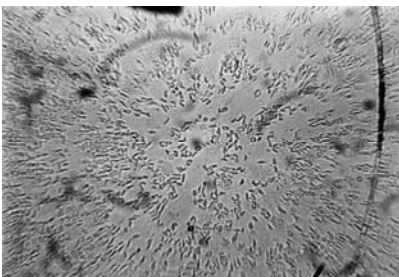


Рис. 5. Бактериеподобные эндосимбионты – содержимое мицетоцитов.
Нативный препарат. Увел.: об. 40х; ок. 3х

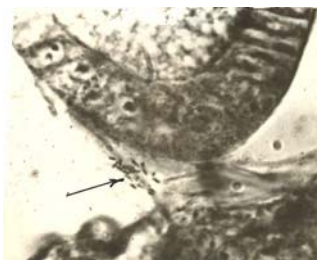


Рис. 6. Бактериеподобные симбионты у основания ооцита. Гистопрепарат.
Железный гематоксилин. Увел. об. 100х; ок. 12,5х

По всей вероятности, проникая в плазму ооцита еще до формирования хориона*, симбионты выполняют не только трофическую и санитарную функции, о чем было упомянуто ранее, но, возможно, и определенную роль в синтезе карминовой кислоты. Надо отметить, что на яичниках араратской кошенили выявлен еще и второй вид мицетомы (рис. 7).

* * Хорион яйца формируется фолликулярными клетками незадолго до овуляции, поэтому яйца араратской кошенили, как и других изученных кокцид, не имеют микропиле. Следует подчеркнуть, что оплодотворение яиц также происходит до образования хориона и выхода яиц из яичников в вагину.



Рис. 7. Второй вид мицетомы на яичнике.
Нативный препарат. Увел. об. 40х; ок. 3х

У равнокрылых, и по-видимому ни у кого более, отмечены антракохиноны и близкие к ним афины. Широко распространенные в мире растений, они синтезируются насекомыми самостоятельно, хотя и из общих исходных продуктов. Некоторые пигменты такого рода флуоресцируют в ультрафиолетовом свете и используются человеком с давних времен. В частности, вырабатываемая кошенилью карминовая кислота не выцветает столетиями, и окрашенные ею средневековые миниатюры до сих пор сохраняют исходную яркость и сочность цвета [2].

Краска, получаемая из араратской кошенили, высоко ценилась в историческом прошлом. Окрашенные ею пряжа, ткани и ковры были желанной добычей завоевателей. Так, согласно ассирийскому клинописному тексту на взятие Мусассирского храма в качестве ценного трофея упоминается шерсть пурпурового цвета стран Урарту и Ханху [8].

В настоящее время есть много способов получения красителя из араратской кошенили [7]. Но вопрос, каким образом синтезируется кармин в теле кошенили и играют ли симбионты определенную роль в этом процессе, пока остается открытым.

ЛИТЕРАТУРА

1. Данциг Е.М. Кокциды Дальнего Востока СССР, 3-366, Л., Наука, 1980.
2. Захваткин Ю.А. Курс общей энтомологии. М., Агропромиздат. 3-319, 1986.
3. Макарян С.Р. Морфологическая характеристика симбионтов араратской кошенили. Биолог. журн. Армении, 33, 9, 980-984, 1980.
4. Мкртчян Л.П. Материалы по биологии размножения араратской кошенили (*Porphyrphora hamelii* Brandt). Биолог. журн. Армении, 29, 8, 44-51, 1976.
5. Мкртчян Л.П., Саркисов Р.Н., Саркисян С.М. О типах строения яичников кокцид (Homoptera, Coccoidea). Биолог. журн. Армении, 33, 3, 279-282, 1980.
6. Мкртчян Л.П., Саркисов Р.Н. Биология и размножение араратской кошенили *Porphyrphora hamelii* Brandt (Homoptera, Coccinea, Margarodidae). Изд-во АН Арм. ССР, Ереван, 5-156, 1985.
7. Саркисов Р.Н., Мкртчян Л.П., Захарян В.А., Севумян А.А. Араратская кошениль. Ереван, изд-во „Гитутюн“ НАН РА, 5- 294, 2010.
8. Пиотровский Б.Б. Ванское царство (Урарту). М., Изд-во Вост. Литература, 1-284, 1959.
9. Buchner P. Endosymbiosis of animals with microorganisms. New York, 909 p, 1965.
10. Sulc K. Intracellulami symbiosa u Margarodesa (Coccidae). Publ. Ec. Htes Et. Veter., Brno, 2, 14, 21, 1923.

Поступила 07.07.2012



Биолог. журн. Армении, 1 (65), 2013

ОПТИМИЗАЦИЯ ПАРАМЕТРОВ БИОСИНТЕЗА L-АЛАНИНА НОВЫМИ ШТАММАМИ-ПРОДУЦЕНТАМИ *BREVIBACTERIUM FLAVUM*

Л.О. МЕЛКОНЯН

Научно-производственный центр “Армбиотехнология” НАН РА
lusine_melk@yahoo.com

Изучены основные параметры процесса биосинтеза L-аланина новыми штаммами-продуцентами *Brevibacterium flavum* GL1 и GL18, ауксотрофными по D-аланину, устойчивыми к D,L-α-аминомасляной кислоте и β-Cl-L-аланину.

Выявлено, что состав питательной среды способствует максимальному накоплению L-аланина. В разработанных условиях штаммы *Br. flavum* GL1 и GL18 продуцируют до 53,7 и 60,5 г/л L-аланина соответственно.

Brevibacterium flavum – штамм-продуцент – L-аланин – ферментация

Ուսումնասիրվել են L-ալանինի կենսասինթեզի հիմնական պարամետրերը՝ D-ալանինի նկատմամբ աուքսոտրոֆ, D,L-α-ամինակարագաթթվի ու β-Cl-L-ալանինի նկատմամբ կայուն *Brevibacterium flavum* GL1 և GL18 նոր շտամ-արտադրիչների միջոցով:

Պարզվել է, որ սննդային միջավայրի կազմը նպաստում է L-ալանինի առավելագույն կուտակմանը: Մշակված պայմաններում *Br. flavum* GL1 ու GL18 շտամներն արտադրում են մինչև 53,7 և 60,5 գ/լ L-ալանին համապատասխանաբար:

Brevibacterium flavum – շտամ-արտադրիչ – L-ալանին – ֆերմենտացիա

The basic process parameters of L-alanine biosynthesis by new strain-producers *Brevibacterium flavum* GL1 and GL18 were studied. They are auxotrophs for D-alanine, resistant to D,L-α-aminobutyric acid and β-chloro-L-alanine.

It was revealed that the composition of nutrient medium had contributed to the maximum accumulation of L-alanine. In the conditions selected, *Br. flavum* GL1 and GL18 produced up to 53.7 and 60.5 g/l of L-alanine, respectively.

Brevibacterium flavum – strain-producer – L-alanine – fermentation

L-аланин – заменимая аминокислота, входящая в состав белков мышечной и нервной тканей. Аланин является важным источником энергии для головного мозга и центральной нервной системы, укрепляет иммунную систему путем выработки антител, активно участвует в метаболизме сахаров и органических кислот.

L-аланин широко применяется в медицине в качестве одного из компонентов смеси для парентерального питания, в сельском хозяйстве и в пищевой промышленности.

Промышленное производство L-аланина было основано на способах ферментативного гидролиза, а в последующем микробиологической трансформации [2, 8, 11, 12].

Анализ источников патентной и другой научно-технической информации в области микробиологического способа получения L-аланина показал, что, несмотря на наличие штаммов-продуцентов L-аланина, полученных на основе микроорганизмов родов *Arthrobacter*, *Escherichia* и *Corynebacterium* [4, 9, 10, 13, 16,], отсутствует промышленное производство этой аминокислоты путем прямой ферментации из источника углерода [8, 17]. Известные штаммы микроорганизмов рода *Brevibacterium* в основном продуцируют рацемическую смесь – DL-аланин [4, 14, 15].

Штаммы-продуценты, способные к сверхсинтезу L-аланина у *Brevibacterium flavum*, впервые были получены в НИТИА (ныне НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА) на основе штамма дикого типа *Br. flavum* ATCC 14067. Наиболее активный штамм *Br. flavum* AA5 (ВКПМ В-3991), нуждающийся для роста в D-аланине (D-ala⁻) и устойчивый к D,L-α-аминомасляной кислоте (D,L-α-AM K-r), в подобранных условиях культивирования продуцировал до 44,0 г/л L-аланина [3].

Нами на основе штамма *Br. flavum* AA5 методом химического мутагенеза были получены новые, устойчивые к β-Cl-L-аланину штаммы *Br. flavum* GL1 (ИНМИА 11841) и *Br. flavum* GL18 (ИНМИА 11842) с повышенным выходом L-аланина.

Целью настоящей работы было проведение оптимизации ферментационной питательной среды и подбор условий аэрации для выявления потенциальной аланинпродуцирующей способности этих штаммов.

Исследована динамика изменения основных физиологических характеристик процесса ферментации L-аланина у новых штаммов-продуцентов *Br. flavum* GL1 и GL18 с целью выявления параметров культивирования, при которых наблюдается максимальное накопление L-аланина.

Материал и методика. В работе использованы штаммы-продуценты L-аланина *Br. flavum* GL1 и GL18, аукоотрофные по D-аланину, устойчивые к D,L-α-аминомасляной кислоте и β-Cl-L-аланину (D-ala⁻; D,L-α-AMK-r; β-Cl-L-ala-r).

В качестве контроля был использован родительский штамм *Br. flavum* AA5.

Оптимизацию состава синтетической ферментационной среды осуществляли варьированием концентрации основных компонентов среды (источники углерода и азота, однозамещенный фосфорнокислый калий, мел, биотин, тиамин) в соответствии с результатами по определению количества аланина в культуральной жидкости (КЖ) в конце ферментации.

Ферментацию проводили на круговой качалке Innova 43 Shaker “New Brunswick Scientific” (США), при температуре 30°C. В колбы Эрленмейера емкостью 500 мл разливали по 15 мл ферментационной среды и 1 мл посевного материала. Посевным материалом служила культура, выращенная в питательной посевной среде следующего состава: сахароза – 3%, (NH₄)₂SO₄ – 3%, KH₂PO₄ – 0,1%, MgSO₄ – 0,1%, CaCO₃ – 3%, FeSO₄ · 7H₂O – 0,001%, MnSO₄ · 5H₂O – 0,001%, тиамина хлорид – 70 мкг/л, биотин – 500 мкг/л, D – аланин 100 мкг/мл. Выращивание посевного материала проводили в колбах емкостью 500 мл с объемом среды 50 мл на круговой качалке при 30°C в течение 16-18 ч.

Содержание L-аланина в КЖ после ферментации определяли методом бумажной хроматографии в системе Парtridge – бутанол : уксусная кислота : вода (4:1:5), с последующим окрашиванием 0,5%-ным раствором нингидрина в ацетоне. Количество аминокислоты определяли колориметрически при длине волны 490 нм после элюирования окрашенных пятен.

Количество остаточного сахара в культуральной жидкости определяли по методу Бертрана [6]. Оптическую плотность (ОП) бактериальной суспензии измеряли на фотоэлектроколориметре КФК-2 при длине волны 540 нм после предварительного растворения мела в среде добавлением 2N HCl.

Результаты и обсуждение. Для получения высокого выхода целевой аминокислоты при микробиологическом синтезе важную роль играют выбранный штамм, состав посевной и ферментационной среды, а также условия ферментации.

Общеизвестно, что в состав сред входят источники углерода, азота, а также минеральные элементы и ростовые факторы, количество и соотношение которых зависят от физиологических и биохимических потребностей конкретного штамма и определяют уровень выхода целевого продукта [5, 7].

Новые штаммы-продуценты *Br. flavum* GL1 и GL18, так же как родительский штамм *Br. flavum* AA5, являются ауксотрофами по D-аланину. В связи с этим, первоначально была изучена зависимость накопления L-аланина в КЖ от начальной концентрации D-аланина как основного ростового фактора, при 15%-ном содержании сахарозы в ферментационной среде. Усредненные данные 5-ти опытов представлены в табл. 1.

Табл. 1. Зависимость накопления L-аланина от концентрации D-аланина в ферментационной среде

D-аланин, мкг/мл	Штамм					
	GL1	GL18	GL1	GL18	GL1	GL18
	выход L-аланина, г/л		остаточный сахар, %		оптическая плотность	
50	28,3	34,6	8,0	6,5	40,0	48,7
100	44,5	52,5	0,78	0,5	52,2	55,5
150	44,0	51,1	0,8	0,54	52,1	55,3
200	42,3	49,4	0,85	0,6	53,8	56,2
250	40,2	47,7	0,78	0,62	54,4	56,6

Из данных, представленных в табл. 1, было сделано заключение, что оптимальная концентрация D-аланина находится в пределах 100-150 мкг/мл. В этом диапазоне наблюдается максимальное накопление L-аланина. При более высоких концентрациях D-аланина практически при одинаковом потреблении источника углерода наблюдается увеличение роста культуры без существенного повышения выхода конечного продукта.

Для выявления максимальной аланинпродуцирующей способности штаммов-продуцентов было исследовано также влияние различных источников углерода при одинаковой начальной концентрации (15% по сахару) на выход L-аланина (табл. 2).

Табл. 2. Влияние различных источников углерода на выход L-аланина

Источник углерода	Выход L-аланина, %	
	штамм	
	GL1	GL18
Глюкоза	65	69
Сахароза	100	100
Меласса	45	55
Сахарный песок	77	83

Как видно из табл. 2, максимальный выход L-аланина наблюдается в том случае, когда в качестве источника углерода используется сахароза.

Нами исследована также динамика утилизации сахарозы в процессе ферментации. Было установлено, что наибольший выход целевого продукта и полное усвоение источника углерода наблюдается к 96-му часу ферментации при 15% начальной концентрации сахарозы (табл. 3).

Как показали дальнейшие исследования, на синтез аланина оказывает влияние не только концентрация сахарозы в ферментационной среде, но и содержание сульфата аммония как источника азота. Результаты представлены в табл. 4.

Табл. 3. Динамика накопления L-аланина штаммами-продуцентами GL1 и GL18 при 15% начальной концентрации сахарозы

Время ферментации, ч	Штамм					
	GL1	GL18	GL1	GL18	GL1	GL18
	выход L-аланина, %		оптическая плотность		остаточный сахар, %	
24	4,4	6,2	23	25	11,3	10,6
48	40,1	42,2	40	44	8,6	7,5
72	60,8	67,1	59	63	4,0	3,1
96	100	100	68	75	0,6	0,4

Табл. 4. Зависимость накопления L-аланина от концентрации сульфата аммония в ферментационной среде

(NH ₄) ₂ SO ₄ , %	Выход L-аланина, %	
	штамм	
	GL1	GL18
3,0	48,8	58,8
4,0	82,1	72,9
5,0	79,5	84,1
5,5	100	100
6,0	76,1	84,1

Как видно из табл. 4, наибольший выход L-аланина достигается при содержании 5,5% сульфата аммония.

Таким образом, максимальная биосинтетическая активность новых штаммов-продуцентов *Br. flavum* GL1 и GL18 наблюдается в среде, содержащей 15% сахарозы и 5,5% сульфата аммония. Отклонения в сторону повышения или понижения концентраций сахарозы и сульфата аммония в ферментационной среде приводили к снижению уровня накопления аланина.

Поскольку немаловажную роль в процессе жизнедеятельности микроорганизмов играют такие макроэлементы, как фосфор и калий, нами были проведены эксперименты по определению их оптимальной концентрации в ферментационной среде (табл. 5).

Табл. 5. Зависимость накопления L-аланина от концентрации однозамещенного фосфорнокислого калия в ферментационной среде

KH ₂ PO ₄ , %	Выход L-аланина, %	
	штамм	
	GL1	GL18
0,1	100	100
0,3	87	92
0,5	63	72
0,7	55	67
1,0	33	42

На основе данных, представленных в табл. 5, можно заключить, что для наибольшего накопления L-аланина оптимальной концентрацией однозамещенного фосфорнокислого калия является 0,1% его содержания в среде. Повышение количества этой соли приводит к уменьшению выхода L-аланина у обоих продуцентов.

Значительную роль в процессе биосинтеза аминокислот продуцентами *Br. flavum* играют витамины. Эксперименты по влиянию различных концентраций

биотина и тиамин показали, что максимальный уровень накопления аланина в КЖ наблюдается при содержании в ферментационной среде 500 мкг/л биотина и 70 мкг/л тиамина.

Усредненные данные 7-и опытов представлены в табл. 6.

Табл. 6. Зависимость выхода L-аланина от концентрации тиамина и биотина в ферментационной среде

Биотин, мкг/мл	Штамм		Тиамин, мкг/мл	Штамм	
	GL1	GL18		GL1	GL18
	выход L-аланина, %			выход L-аланина, %	
100	69	75	50	45	51
200	79	84	60	49	55
300	80	89	70	100	100
400	87	93	80	90	96
500	100	100	90	77	89
600	100	100	100	65	71

Для поддержания в течение всего процесса ферментации оптимума pH (pH 7-8), необходимого для нормального роста культур и синтеза L-аланина, в ферментационную среду добавляли мел. Результаты представлены на рис. 1.

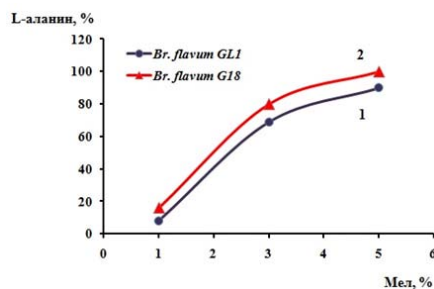


Рис. 1. Зависимость накопления L-аланина от концентрации мела в ферментационной среде

Эксперименты показали, что снижение концентрации мела в ферментационной среде ниже 5% приводит к снижению pH среды в процессе ферментации, что отрицательно влияет на накопление L-аланина.

Кислород является одним из тех факторов, который в процессе культивирования микроорганизмов существенно влияет на рост штаммов и на синтез аминокислот. В связи с этим изучалось влияние уровня аэрации на синтез аланина. Для этого была проведена серия экспериментов по ферментации на качалке с разным числом оборотов вращения в минуту – 150-300 об/мин.

Усредненные результаты экспериментов со штаммом GL18, изображенные графически (рис. 2), наглядно показывают, что наибольшее количество целевой аминокислоты накапливается при ферментации на качалке со скоростью вращения 200, 220 об/мин. Соответствующие эксперименты позволили выяснить, что при ферментации на качалке с большим или меньшим числом оборотов замедляется рост изучаемых продуцентов и контрольного штамма, вследствие чего не полностью утилизируется источник углерода среды и не синтезируется возможно максимальное количество L-аланина.

В серии экспериментов, когда в процессе ферментации меняли скорость вращения инкубационной качалки, выяснилось, что потребность культур в кислороде неодинакова на протяжении всего процесса. Сравнение кривых, представленных на рис. 2, показало, что по своим основным характеристикам проведение ферментации при поэтапном изменении скорости вращения качалки превосходит контрольные ферментации при постоянном уровне аэрации.

При ведении процесса при разных режимах аэрации 250 об/мин до 24 ч и 220 об/мин после 24 ч и до конца ферментации обеспечивается накопление в КЖ большего количества L-аланина.

На основании полученных данных наиболее рациональным оказалось ведение процесса биосинтеза L-аланина при скорости вращения качалки 250 об/мин до стационарной фазы роста культур и 220 об/мин до конца ферментации. При указанных параметрах ведения процесса наблюдается максимальный рост штаммов, наибольшая конверсия сахара и выхода L-аланина.

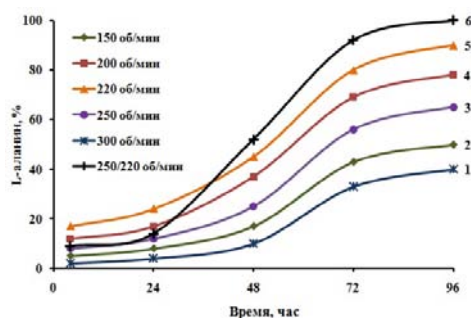


Рис. 2. Результаты ферментации штамма-продуцента *Br. flavum* GL18 в разных условиях аэрации, об/мин

1)300; 2) 150; 3)250; 4)200; 5)220; 6)250/220

Степень накопления аминокислоты, в том числе L-аланина в ферментационной среде во многом зависит от количества, качества и возраста используемого посевного материала. Следовательно, для получения активного инокулята необходимо сделать правильный подбор и определить оптимальные условия выращивания посевного материала.

Согласно результатам роста культуры, при оптимизации посевной среды по источникам углерода и азота, были выбраны следующие показатели: сахароза – 3%; сульфат аммония – 3%.

В опытах с целью определения оптимального возраста посевного материала использовалась культура, выращенная в течение 8, 12, 18, 20, 24 ч. Результаты по биосинтезу аланина в зависимости от возраста посевного материала (ВПМ) представлены в виде диаграммы на рис. 3.

Как видно из рис. 3, максимальное накопление L-аланина в КЖ наблюдается при засеве ферментационной питательной среды посевным материалом, выращенным в течение 18-20 ч, что соответствует концу экспоненциальной фазы роста культур. Дальнейшее увеличение продолжительности выращивания посевного материала приводит к снижению выхода целевого продукта. Уменьшение синтеза аланина наблюдается также при использовании посевного материала, взятого в начале экспоненциальной фазы роста продуцентов.

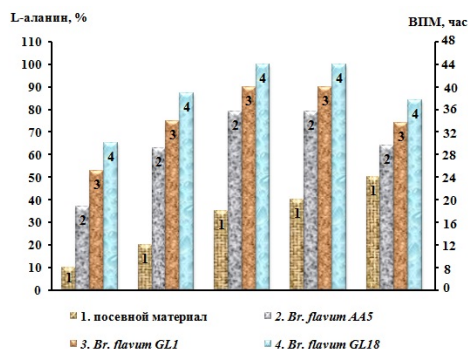


Рис. 3. Зависимость выхода L-аланина от возраста посевного материала

Таким образом, на основе результатов исследования физиологических особенностей новых штаммов-продуцентов *Br. flavum* GL1 и GL18 и оптимизации технологических параметров процесса ферментации установлено, что наибольшее накопление L-аланина (53,7 г/л и 60,5 г/л соответственно) достигается в среде следующего состава: сахара – 15%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 5,5%, KH_2PO_4 – 0,1%, MgSO_4 – 0,1%, CaCO_3 – 5%, биотин – 500 мкг/л, тиамин – 70 мкг/л, D-аланин 100 мкг/мл, при скорости вращения качалки 250 об/мин до стационарной фазы роста культур и далее 220 об/мин до конца ферментации (рис. 4).

Полученные новые штаммы *Br. flavum* GL1 и GL18 превосходят по выходу целевого продукта, коэффициенту конверсии сахара и производительности процесса родительский штамм *Br. flavum* AA5.

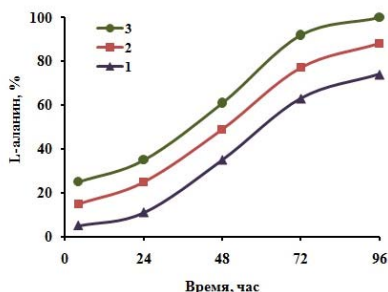


Рис. 4. Сравнительный выход L-аланина у штаммов-продуцентов *Br. flavum*:
1. *Br. flavum* AA5; 2. *Br. flavum* GL1; 3. *Br. flavum* GL18

Предлагаемый нами способ получения L-аланина штаммами-продуцентами *Br. flavum* GL1 и GL18 запатентован в Республике Армения [1].

ЛИТЕРАТУРА

1. Аветисова Г. Е., Мелконян Л. О., Чахалян А. Х., Сагиян А. С. Способ получения L-аланина. Патент РА, № 2691 А, 2012.
2. Дюкова К.Г., Агаджанян А.Е., Амбарцумян А.А., Алебян Г.П. Усовершенствованная технология получения D-аспарагиновой кислоты и L-аланина путем биотрансформации DL-аспарагиновой кислоты. Биотехнология, № 4, 69-77, 2009.

3. Патент США. 1992. № 5124257.
4. Патент США. 1996. № 5559016.
5. Тимощенко Л.В., Чубик М.В., Пестряков А.Н. Основы микробиологии и биотехнологии. 2012.
6. Филипович Ю.Б., Егорова Т.А., Севастьянова Г.А. Практикум по общей биохимии. М., 1982.
7. Goyal D. General Microbiology. 2007.
8. Dworkin M., The Prokaryotes: Symbiotic associations, biotechnology, applied microbiology. 3rd ed. /Kumagai H., Springer, 1, Chapter 3.2. p. 756–765, 2006.
9. Hashimoto S., Katsumata R. L-Alanine fermentation by an alanine racemase-deficient mutant of the dl-alanine hyperproducing bacterium *Arthrobacter oxydans* HAP-1. J. Ferm. Bioeng., 86, 4, p. 385–390, 1998.
10. Hashimoto S., Katsumata R. Overproduction of alanine by *Arthrobacter* strains with glucose-nonrepressible L-alanine dehydrogenase. Biotechnol. Lett., 15, 11, pp. 1117–1122, 1993.
11. Hols P., Kleerebezem M., Schanck A., Ferain T., Hugenholtz J., Delcour J., De Vos W. Conversion of *Lactococcus lactis* from homolactic to homoalanine fermentation through metabolic engineering, Nat. Biotechnol., 17, pp. 588–592, 1999.
12. Ikeda M. Amino Acid Production Processes. Adv. Biochem. Engin./Biotechnol., 79, pp. 1–35, 2003.
13. Lee M., Smith G.M., Eiteman M.A., Altman E. Aerobic production of alanine by *Escherichia coli* aceF ldhA mutants expressing the *Bacillus sphaericus* alaD gene. Appl. Microbiol. Biotechnol., 65, 1, p. 56–60, 2004.
14. Nagwa M. A., Zaki D.A., Abd-El-Aziz F. Activation of Alanine Biosynthesis by *Brevibacterium flavum* Through Optimization of Culture Conditions, UV Irradiation and EMS Using Low Quality Dates, J. Appl. Sci. Res., 3, 12, pp. 1950–1959, 2007.
15. Shen Q., Shao G., Zhao M., Chen T. DL-alanine fermentation by a mutant of *Brevibacterium flavum* ATCC 21269. Weishengwuxue Zazhi, 10, 4, pp. 1–5, 1990.
16. Smith G.M., Lee S.A., Reilly K.C., Eiteman M.A., Altman E. Fed-batch two-phase production of alanine by a metabolically engineered *Escherichia coli*. Biotechnol. Lett., 28, 20, pp. 1695–1700, 2006.
17. Wada M., Narita K., Yokota A. Alanine production in an H⁺-ATPase- and lactate dehydrogenase-defective mutant of *Escherichia coli* expressing alanine dehydrogenase. Appl. Microbiol. Biotechnol., 76, 4, pp. 819–825, 2007.

Поступила 06.08.2012



Биол. журн. Армении, 1 (65), 2013

ОБ ОБНАРУЖЕНИИ ПАРТЕНОГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ *BROMIUS*
OBSCURUS (LINNAEUS, 1758)
(*COLEOPTERA*, *CHRYSOMELIDAE*) В АРМЕНИИ

Г.А. КАРАГЯН*, А.Э. АЙВАЗЯН*, М.Ю. КАЛАШЯН*,
СТЕПАНЯН*, О.Л. НЕСТЕРОВА**

И.Э.

*Научный центр зоологии и гидроэкологии НАН РА
gaykaragyan@yahoo.com

**Белорусский государственный университет

В Сюникском марзе Армении обнаружена партеногенетическая популяция листоеда *Bromius obscurus* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera, Chrysomelidae). Изучен ее кариотип, выявлен хромосомный полиморфизм по числу хромосом в наборе, которое варьирует в пределах 22-24, при этом последнее число преобладает. Вопрос плоидности жуков данной популяции остается открытым.

Chrysomelidae – Bromius obscurus – армянская партеногенетическая популяция – кариотип

Հայաստանի Սյունիքի մարզում հայտնաբերվել է տերևակեր բզեզի *Bromius obscurus* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera, Chrysomelidae) կուսածին պոպուլյացիա: Ուսումնասիրվել է նրա կարիոտիպը: Բացահայտվել է քրոմոսոմային պոլիմորֆիզմի երևույթը. քրոմոսոմների քանակը հավաքակազմում տատանվում է 22-24-ը՝ վերջին թիվը գերակշռում է: Բզեզների տվյալ պոպուլյացիայի պոլիդության հարցը մնում է բաց:

Chrysomelidae – Bromius obscurus – Հայկական կուսածին պոպուլյացիա – կարիոտիպ

Parthenogenetic population of leaf beetle *Bromius obscurus* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera, Chrysomelidae) was found in Syunik province of Armenia. Karyotype of the population was studied. Chromosomal polymorphism was revealed, chromosome number in the set ranged between 22 and 24 with the last number prevalent. Question of the ploidy in the studied population remained unclear.

Chrysomelidae – Bromius obscurus – Armenian parthenogenetic population – karyotype

Партеногенетическое размножение является типом генетического полиморфизма, который встречается спорадично у насекомых, в том числе, в относительно немногочисленных случаях – у жуков. При этом для многих видов известны как партеногенетические, так и двуполые популяции [2, 10, 13]. К числу таких видов относится листоед падушка черная – *Bromius* [= *Adoxus*] *obscurus* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera, Chrysomelidae). Вид имеет голарктическое распространение, интродуцирован в Новую Зеландию. Кормовыми растениями *B. obscurus* являются иван-чай (*Epilobium angustifolium* Linnaeus, 1753, вероятно, и другие виды *Epilobium*) и виноград (*Vitis* spp.); жуки изредка повреждают также листья роз (*Rosa* spp.) [7, 9, 15]. Известно, что при численности 10-15 жуков на один куст этот листоед может иметь вредоносное значение для виноградарства [9].

В Армении *B. obscurus* встречается в зарослях иван-чая. Хотя на винограде вид пока не зарегистрирован, однако при массовом размножении он потенциально может приобрести вредное значение и у нас в республике.

Известно, что *B. obscurus* представлен в разных частях ареала обоеполюми и партеногенетическими популяциями [6, 14]. Согласно единственной работе, в которой были описаны кариотипы *B. obscurus*, партеногенетические самки ряда европейских популяций имеют триплоидный набор хромосом ($3n=24$), в то время как двуполые популяции из Северной Америки диплоидны ($2n=16$) [14].

В ходе экспедиционных работ в Сюникской области Армении нами была обнаружена многочисленная популяция *B. obscurus*, представленная исключительно самками. Поскольку до сих пор кариотипы *B. obscurus* были описаны из географически изолированных популяций, более того, имеющих расы разной пloidности, мы посчитали интересным изучить кариотип армянской популяции в целях выяснения возможной кариологической гетерогенности этого вида в Армении.

Материал и методика. Имаго жуков были собраны в Армении в окрестностях г. Каджаран (N39.155350 E46.103800, 2071 м. н.у.м) в конце июня 2011 г. на цветущем *E. angustifolium*. Всего было собрано около 50 экз. жуков, которые оказались самками. Из них 24 были зафиксированы в этанол-уксусной смеси в соотношении 3:1 для дальнейших кариологических исследований.

Хромосомные препараты изготавливались из яичников жуков по методике Рожек [11] с некоторой модификацией. Из имаго самок извлекались яичники и помещались в колхицин-гипотонический раствор (0.005%-ный раствор колхицина в 1%-ном цитрате натрия) на 30-40 мин, после чего фиксировались в этанол-уксусной смеси в соотношении 3:1 – 96% этанол : ледяная уксусная кислота. Дальнейшая обработка включала две последовательные фиксации, по 30 мин каждая, в этанол-уксусных смесях с возрастающими концентрациями уксусной кислоты, при температуре 32(С. Такая обработка обеспечивала хорошую мацерацию тканей. Затем материал раздавливался в 1-2-х каплях 70%-ной уксусной кислоты между двумя чистыми предметными стеклами и замораживался на блоке твердой углекислоты [1]. Далее с помощью острого лезвия предметные стекла отделялись друг от друга и высушивались струей теплого воздуха. Препараты окрашивались 4%-ным раствором красителя Гимза в фосфатном буфере (pH 6.8) в течение 10 мин.

Микрофотографирование кариотипов проводилось на микроскопе Воесо (BM-180/I/PI) при увеличении $\times 1000$.

Результаты и обсуждение. В процессе препаровки жуков выяснилось, что все собранные экземпляры каджаранской популяции *B. obscurus* были самками. Также исключительно самками были представлены небольшие серии жуков, собранных в той же местности в 1998 (45 экз.) и 2005 гг. (36 экз.). Таким образом, мы полагаем, что изученная нами популяция является партеногенетической.

Изучение кариотипа каджаранской популяции *B. obscurus* выявило хромосомный полиморфизм по числу хромосом в наборе. Так, число хромосом, даже у одной особи, варьирует в пределах 22-24, при этом преобладает последнее число.

В метафазных пластинках с преобладающим числом хромосом, равным 24, обнаружено 5 хромосомных триплетов, в том числе один триплет крупных метацентрических и 4 триплета метацентрических хромосом средних размеров, составляющих плавно убывающий размерный ряд (рис. 1 А, Б). Кроме того, в кариотипе присутствуют 3 пары гомологичных метацентриков – одна пара крупная, с хромосомами, равными по размеру хромосомам триплета крупных метацентриков, и две пары гомологичных хромосом средних размеров. В кариотипе всегда присутствует одна пара гомологичных акроцентриков и одна субтелоцентрическая хромосома средних размеров, не имеющая аналога в наборе.

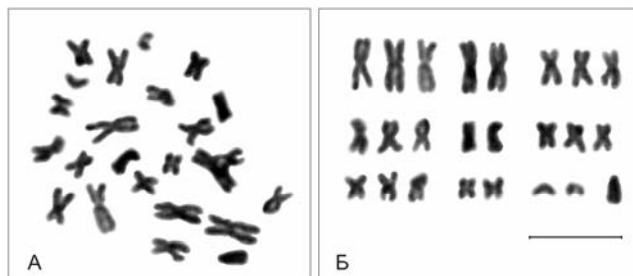


Рис. 1. Кариотип *Bromius obscurus*. А – метафаза митоза; Б – кариограмма

В семействе Chrysomelidae известны немногочисленные случаи партеногенетического размножения, подтвержденные цитогенетически – всего у 11 видов из 6 родов [2]. Первые сообщения о вероятно партеногенетическом размножении *B. obscurus* были приведены еще в работах конца XIX века [3, 4 и др.]. Так, Жоберт сообщал [3], что среди большого количества изученных экземпляров (3728) не было обнаружено ни единого самца, более того, в сперматеке (receptacula seminis) самок не было спермы. Тем не менее, наличие партеногенеза у европейских *B. obscurus* ставилось под сомнение некоторыми авторами, которые сообщали о находках самцов в Центральной и Южной Европе [8, 12, 18]. Возможность существования двуполых популяций вида в некоторых регионах Центральной и Южной Европы не исключена, хотя случаи обнаружения единичных самцов в европейских популяциях не являются доказательством бисексуальности этих популяций. Известны случаи неоднократного нахождения единичных самцов у облигатных партеногенетических видов, однако эти самцы скорее всего являются результатом нарушений в процессе клеточных делений [6]. Согласно более поздним сообщениям, во многих местообитаниях вида в Европе были найдены исключительно самки [5, 6, 16, 17].

Кариотипы как партеногенетических (Финляндия и Швейцария), так и двуполых (Западная и Восточная Канада) популяций *B. obscurus* были описаны в работе, посвященной кариологии вида [14]. В кариотипе североамериканских двуполых популяций *B. obscurus* было обнаружено диплоидное число хромосом $2n=16$ и XY половые хромосомы у самцов, образующие в метафазе I мейоза бивалент типа “парашют” (X_{Yr}). Для европейских популяций, согласно Суомалайнену [14], характерен апомиктический (apomictic) партеногенез, т.е. неоплодотворенные яйца подвергаются только эквационному мейотическому делению, при этом редукционное деление отсутствует. В кариотипе партеногенетических самок им были обнаружены 24 метацентрические хромосомы. Следует отметить, что кариотипы этих самок проиллюстрированы крайне неудачно, что затрудняет интерпретацию набора. Сам автор описывает этот кариотип как триплоидный, состоящий из 8 триплетов ($n=8$), включая 2 триплета крупных метацентриков, хромосомы остальных триплетов образовывали плавно убывающий размерный ряд.

Однако наши данные входят в явное противоречие с интерпретацией Суомалайнена [14]. Как показано выше, кариотип армянской популяции *B. obscurus* состоит как из хромосомных триплетов, так и из пар гомологичных хромосом, а одна субтелоцентрическая хромосома вовсе не имеет аналога в наборе. Таким образом, вопрос пloidности этой популяции остается открытым. Для объяснения хромосомного полиморфизма и происхождения кариотипа армянской популяции *B. obscurus* необходимо продолжить начатые нами исследования, в том числе с применением дифференциальных методов окрашивания хромосом.

Исследование выполнено при финансовой поддержке проекта совместных исследований "ГКН-БРФФИ-2011, грант № 11РБ-018 и проекта № *zoo-2415, Armenian National Science and Education Fund (ANSEF).

Авторы рады выразить свою искреннюю признательность Д. Василян (Dr. Davit Vasilyan, Terrestrial Palaeoclimatology Institute for Geoscience, Eberhard-Karls University, Tuebingen, Germany) за помощь в получении части необходимых для данной работы литературных источников.

ЛИТЕРАТУРА

1. Conger A.D., Fairchild L.M. A quick-freeze method for making smear slides permanent. *Stain Techn.*, 28, 289-293, 1953.
2. Furth D.G. A new case of parthenogenesis in beetles: *Longitarsus melanurus* (Melsheimer) (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. New York Entomol. Soc.*, 102, 3, 310-317, 1994.
3. Jobert M. Recherches pour servir a l'histoire de la generation chez les insectes. *Comptes Rendus Séances Acad. Sci.*, 93, 975-977, 1881.
4. Jolicoer H., Topsent E. Etudes sur l'escrivain on gribouri (*Adoxus vitis* Kirby). *Mem. Soc. Zool. France*, 5, 723-730, 1892.
5. Lindroth C.H. Våra skalbaggar och hur man känner igen dem. Del. II. Stockholm: Albert Bonniers Förlag. (In Swedish.). 1943.
6. Lokki J., Saura A., Lankinen P., Suomalainen E. Genetic polymorphism and evolution in parthenogenetic animals. V. Triploid *Adoxus obscurus* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Genet. Res. Camb.*, 28, 1, 27-36, 1976.
7. Mohr K.H. *Chrysomelidae*. In: H. Freude, K.W. Harde and G.A. Lohse (eds.), *Die Käfer Mitteleuropas*, 9, Goecke and Evers, Krefeld, 95-299, 1966.
8. Müller J. Über das Männchen von *Adoxus obscurus* L. *Zoologischer Anzeiger*, 27, 39-41, 1904.
9. Pest Alert. Western Grape Rootworm (*Bromius obscurus*).
<http://www.agf.gov.bc.ca/cropprot/bromius_obscurus.pdf> Downloaded on 15 May 2012.
10. Robertson J.G. The chromosomal cytology of bisexual and parthenogenetic *Calligrapha* spp. (Coleoptera: Chrysomelidae). *Can. Ent.*, 96, 1-2, 144, 1964.
11. Rožek M. A new chromosome preparation technique for Coleoptera (Insecta). *Chromosome Research*, 2, 76-78, 1994.
12. Schaufuss C. Calwer's Käferbuch. 6 Aufl. Stuttgart: Hoffmansche Buchdruckerei, Felix Kraus. 1916.
13. Smith S.G. Parthenogenesis and polyploidy in beetles. *Amer. Zool.*, 11, 341-349, 1971.
14. Suomalainen E. Die Polyploidie bei dem parthenogenetischen Blattkäfer *Adoxus obscurus* L. (Coleoptera: Chrysomelidae). *Zoologische Jahrbücher*, 92, 183-192, 1965.
15. Suomalainen E., Saura A., Lokki J. Cytology and Evolution in Parthenogenesis. CRC Press, Boca Raton, 1987.
16. Székessy W. Über Parthenogenese bei Kolenopteren. *Biologia Generalis*, 12, 577-590, 1937.
17. Vandel A. La parthénogenèse. Paris: G. Doin., 1931.
18. Winkler H. Verbreitung und Ursache der Parthenogenesis im Pflanzen- und Tierreiche. Jena: Gustav Fischer. 1920.

Поступила 23.05.2012



Биолог. журн. Армении, 1 (65), 2013

ИЗМЕНЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ТИРЕОТРОПНОГО ГОРМОНА ГИПОФИЗА И ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ В КРОВИ У ШЕСТИМЕСЯЧНЫХ КРЫС ПРИ ГИПОТИРЕОЗЕ

Т.С. ХАЧАТРЯН

*Институт прикладных проблем физики НАН РА
lira-r@mail.ru*

Целью настоящего исследования явилось изучение особенности концентрации тиреотропного гормона гипофиза и тиреоидных гормонов в крови у крыс с экспериментальным гипотиреозом до и после действия инъекций холинового эфира N-(2-метоксibenзоил)-о-изопропил- α,β -дегидротирозина. Исследования показали, что у шестимесячных крыс при гипотиреозе происходило резкое повышение уровня тиреотропного гормона гипофиза и резкое понижение уровня тиреоидных гормонов в крови.

*Тиреоидные гормоны – гипотиреоз – холиновые эфиры – щитовидная железа –
возрастные группы*

Սույն ուսումնասիրության նպատակն էր հետազոտել հիպոֆիզի թիրեոիդ հորմոնի և վահանազեղծի հորմոնների բաղադրության աստիճանը վեց ամսական առնետների արյան մեջ, փորձարարական հիպոթիրեոզի պայմաններում, քլիլի էսթեր N-(մեթոքսիբենզոիլ)-O-իզոպրոպիլ- α,β -դեհիդրոթիրոզին օգտագործելուց առաջ և հետո: Ուսումնասիրությունները ցույց են տվել, որ վեց ամսական առնետների մոտ փորձարարական հիպոթիրեոզի պայմաններում կենդանիների արյան մեջ տեղի է ունենում հիպոֆիզի թիրեոիդ հորմոնի բաղադրության կտրուկ նվազում:

Թիրեոիդ հորմոն – հիպոթիրեոզ – քլիլի էսթերներ – վահանազեղծ – տարիքային խմբեր

The aim of this study was to investigate the features of pituitary thyroid hormone concentrations and thyroid hormones in the blood of rats with experimental hypothyroidism before and after injection of the choline ester of N-(2-methoxybenzoyl)-O-isopropyl- α,β -dehydrothyrozone. Studies have shown that a sharp increase in solution of pituitary thyroid hormone level and a sharp drop in the level of thyroid hormones in the blood of six-month rats with hypothyroidism occur.

Thyroid hormones – hypothyroidism – choline esters – thyroid gland – age groups

В настоящее время одной из наиболее распространённых патологий щитовидной железы (ЩЖ) млекопитающих является её дисфункция – гипотиреоз (ГПТ) – клинический синдром, вызванный длительным, стойким недостатком тиреоидных гормонов (ТГ) в организме, сопровождающийся снижением их биологического эффекта на тканевом уровне. Имеются тяжёлые осложнения, такие как кретинизм, сердечная недостаточность, выпот в серозные полости, вторичная аденома гипофиза. Наиболее часто ГПТ развивается в исходе аутоиммунного тиреоидита, реже – после резекции ЩЖ и терапии радиоактивным I^{131} . [7, 9]. Заболевания

ЩЖ могут протекать с нарушением структуры и функции (с изменением гормонального фона). Нарушение функции ЩЖ свидетельствует о снижении (ГПТ) или повышении (тиреотоксикоз, гипертиреоз) выработки ТГ – тироксина (Т4) и трийодтиронина (Т3) [2]. Особый интерес в связи с этим представляет выяснение возрастных особенностей регуляции функции ЩЖ при ГПТ. Всестороннее изучение этого вопроса открывает перспективы в разработке новых подходов к лечению осложнений ГПТ у разных возрастных групп больных. Известно, что системе нейроэндокринной регуляции клетки, помимо ТГ и стероидных гормонов (СГ), составляют также нейромедиаторы (НМ), одним из которых является ацетилхолин (АХ), являющийся одним из эфиров холина [10]. Ранее нами было показано [1], что в корригировании соматических и нейрогенных нарушений не второстепенна роль эфиров и амидов холина, что заслуживает существенного внимания с точки зрения особенностей их синтеза и биологической активности. Вместе с тем отсутствуют сведения относительно действия эфиров и амидов холина на изменение показателей ТТГ, общего Т3 и Т4 в крови у крыс различных возрастных групп при патологиях ЩЖ типа ГПТ.

Учитывая вышесказанное, нами в данных сериях научных исследований проведено изучение действия холинового эфира N-(2-метоксибензоил)-О-изопропил- α,β -дегидротирозина, относящегося к эфирам холина, на изменение показателей ТТГ, общего Т3 и Т4 в крови у шестимесячных крыс при ГПТ.

Материал и методика. Исследования проведены на 50 шестимесячных крысах-самцах (линии Вистар, массой 180-220 г), так как они удобны для массовых экспериментов и у них по сравнению с собаками, кошками, кроликами отмечается большая интенсивность физиологических показателей, протекающих в значительно более короткие промежутки времени, что является весьма приемлемым для ближайших и в особенности отдалённых наблюдений, связанных с изучением состояния восстановительных процессов. ГПТ вызывался путём проведения тиреоидэктомии, которая осуществлялась по следующему алгоритму. До 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 обнажалась ЩЖ, производилась отпрепаровка 2/3 её части с сохранением парашитовидных желез и с помощью острых ножниц доли отсекались, 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. Тиреоидэктомия в данных сериях экспериментальных исследований была проведена у 50 крыс. Животные были разделены на 3 подопытные группы: 1) интактные животные – 10 экз.; 2) животные с ГПТ, не получавшие каждодневных инъекций холинового эфира N-(2-метоксибензоил)-О-изопропил- α,β -дегидротирозина (ХЭД), – 10 экз.; 3) животные с ГПТ, получавшие ХЭД в дозе 200 мкг/кг массы тела в течение 14 дней, – 30 экз..

После тиреоидэктомии и окончания дачи ХЭД у всех 50 крыс была проведена декапитация и сбор крови. В сыворотке с помощью иммуноферментного метода определялась концентрация ТТГ, общего Т3 и Т4.

Полученные данные статистически обработаны в системе Statistica for Windows, с применением распределения Пуассона и критерия Пирсона.

Результаты и обсуждение. Тиреоидэктомия у крыс 2 подопытной группы приводила к возникновению у них характерных сдвигов в содержании ТТГ и ТГ в крови, которые отражали возникновение у них состояния ГПТ. Как видно на рис.1, Б – тиреоидэктомия приводила к значительному повышению содержания ТТГ (на 300 %)

в сыворотке крови у крыс данной подопытной группы; содержание общего Т3 снижалось на 81,4 % по сравнению с интактными животными (рис. 1, А); содержание же общего Т4 снижалось на 27,6 % соответственно. После введения ХЭД в дозе 200 мкг/кг массы тела в течение 14 дней у крыс 3 подопытной группы были отмечены следующие показатели: содержание ТТГ в крови составило 128,5% по

сравнению с нормой, принятой за 100 % (рис. 1, А); содержание общего Т3 составило 85,1 %; содержание общего Т4 составило 80,8 % (рис. 1, В).

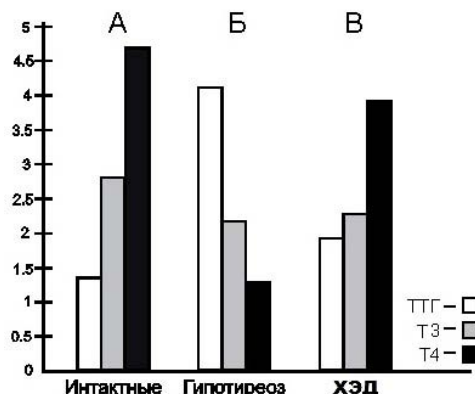


Рис. 1. Особенности изменения концентрации тиреотропного гормона гипофиза и тиреоидных гормонов в крови у шестимесячных крыс в норме (А), при гипотиреозе (Б) и после действия холинового эфира N-(2-метоксibenзоил)-о-изопропил- α,β -дегидротирозина (В). Концентрация тиреотропного гормона гипофиза выражена в мМЕ/мл; трийодтиронина в нг/мл; тироксина в мкг/мл.

Анализируя полученные данные, можно прийти к выводу, что применение ХЭД способствует частичной нормализации (практически до нормы) вышеуказанных показателей ТГ в крови у шестимесячных крыс. Что же касается показателей ТТГ, то они превышают норму на 28,5 %, что свидетельствует о неблагоприятном влиянии используемой дозы ХЭД на показатели ТТГ у исследуемой возрастной группы животных. В этом случае, вероятно, будет целесообразным применение меньшей дозы ХЭД. При действии холинового эфира N-(2-метоксibenзоил)-О-изопропил- α,β -дегидротирозина в крови у крыс происходило понижение концентрации ТТГ и повышение уровня ТГ и достигало их значений у интактных животных.

Полученные в представленных сериях исследований результаты могут иметь важное теоретическое значение для понимания биохимических механизмов действия синтетических аналогов НМ, родственных АХ, на уровне организма млекопитающих. Они могут существенно восполнить пробелы в области биохимических исследований роли синтетических производных холина в изменении концентрации ТТГ, общего Т3 и Т4 при экспериментальном ГПТ у крыс различных возрастных групп. Полученные результаты могут быть учтены и в клинической практике при прогнозировании течения и исхода функционального восстановления у лиц с патологией ЩЖ, такой как ГПТ.

Представленный анализ недавних изучений нейропротекторных агентов, антиоксидантов, стволовых клеток, вакцин, различных хирургических техник позволяют заключить, что нужны новые эффективные средства для лечения экспериментальной патологии ЩЖ крыс типа ГПТ [3, 4, 6]. С учётом мультифакторной и мультифазной модели развития патологий ЩЖ, таких как ГПТ, на наш взгляд, эффективным методом может стать нейропротекторная стратегия терапии синтетическими производными холина типа ХЭД [5, 8].

ЛИТЕРАТУРА

1. Киприян Т.К., Топузян В.О., Карапетян И.Р., Хачатрян Т.С. Анализ влияния сочетанного комплекса тироксина и йодметилата 2 – (диметиламино) этилового эфира – N-(п-метоксибензоил)-DL-фенилаланина на электрическую активность повреждённых травмой одиночных мотонейронов спинного мозга крыс. В сб. Международная научная конференция „Актуальные проблемы интегративной деятельности и пластичности нервной системы“, посвящ. 80-летию со дня рождения академика НАН РА и чл.-корр. РАН В.В. Фанарджяна, Ереван, изд. Гитутюн НАН РА, с. 154-158, 2009.
2. Матинян Л.А., Аветисян А.А. Влияние симпатической нервной системы на электрокардиограмму и дыхание при тиреотоксикозе у крыс. В сб.: „II съезд Армянского физиологического общества“, Ереван, Изд. АН АрмССР, с. 46-52, 1974.
3. Матинян Л.А., Бабаханян М.А., Киприян Т.К., Хачатрян Т.С., Марченко З.И. Сравнительное изучение частоты сердечного ритма у гипотиреоидных крыс в норме и при действии йодированного мёда и тироксина. Ж. Вестник МАНЭБ, 11, 8, с. 221- 223, 2006.
4. Матинян Л.А., Нагапетян Х.О., Хачатрян Т.С. Протекция сочетанным комплексом тироксина и йодметилата 2 – (диметиламино) этилового эфира –N-(п-метоксибензоил)-DL-фенилаланина вызванной активности одиночных мотонейронов спинного мозга крыс при экспериментальном гипотиреозе. В сб. Международная научная конференция „Актуальные проблемы интегративной деятельности и пластичности нервной системы“, посвящ. 80-летию со дня рождения академика НАН РА и чл. – корр. РАН В. В. Фанарджяна, Ереван, изд. „Гитутюн“ НАН РА, с. 175-178, 2009.
5. Мнджоян О.Л., Топузян В.О. Методы синтеза и свойства β -диметиламиноэтиловых и холиновых эфиров аминокислот и пептидов, Успехи химии., 1, 12, 2198- 2211, 1981.
6. Хачатрян Т.С., Киприян Т.К. Изменение суммарной и одиночной электрической активности интернейронов и мотонейронов спинного мозга крыс при гипотиреозе и гипертиреозе. Ж. Информационные технологии и управление, 4-3, с. 46-51, 2006.
7. Bottcher C., von Roepenack-Lahaye E., Schmidt J., Clemens S., Scheel D. Analysis of phenolic choline esters from seeds of Arabidopsis thaliana and Brassica napus by capillary liquid chromatography/electrospray- tandem mass spectrometry. J. Mass spectrum., 4, 44, pp. 466-476, 2009.
8. Carter C.R., Cao L., Cawai H., Smith P.A., Dryden W.F., Raftery M.A., Dunn S.M. Chain length dependence of the interactions of bisquaternary ligands with the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor. J. Biochem. Pharmacol., 3, 73, pp. 417-426, 2007.
9. Jorde R. J. Tidsskr. "Subclinical" thyroid disease. Nor. Lageforen., 9, 122, pp. 938-940, 2002.
10. Patil C., Paul R., Malkanna A. Neuroendocrine regulation and pesticidal impact on freshwater crab, Barytelphusa guerini (H. Milne Edwards). J. Environ. Biol., 6, 29, pp. 887-892, 2008.

Поступила 29.08.2012



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 1(65), 2013

«ՏԵՐԵՐԻ ԼԱՅՆ ՍՊԵԿՏՐ-ՎԱՐԱԿՎԱԾՈՒԹՅԱՆ ԲԱՐՁՐ ԷՔՍՏԵՆՍԻՎՈՒԹՅՈՒՆ»
ԿԱՊԻ ԲԱՅԱՀԱՅՏՈՒՄԸ ԿՈՎԿԱՍԻ
ԵՐԿՈՒ ՆՍՍԱԿՑԱՑ ՏԵՍԱԿԻ ԹՈՉՈՒՆՆԵՐԻ ԼԵՅԿՈՑԻՏՈԶՈՆՈՆ
ՑԵՂԻ ՄԱԿԱԲՈՒՑՈՆԵՐԻ ՄՈՏ

Ս.Ա.ԱՂԱՅԱՆ

Երևանի պետական համալսարան, կենդանաբանության ամբիոն,
ՀՀ ԳԱԱ կենդանաբանության և հիդրոէկոլոգիայի գիտական կենտրոն,
Կենդանաբանության ինստիտուտ
asargisa@gmail.com

Մակարոյժ – տեր փոխհարաբերությունները լիակատար հասկանալու համար անհրաժեշտ է բացահայտել տերերի աշխարհագրական տարածվածության ազդեցությունը մակարոյժներով վարակվածության էքստենսիվության վրա: Կիրառելով հետազոտության ՊՇՌ մեթոդները մենք ուսումնասիրել ենք «Տերերի լայն սպեկտր – վարակվածության բարձր էքստենսիվություն» կապը Կովկասի երկու նստակյաց տեսակի թռչունների (*Parus major*, *P. caeruleus*) լեյկոցիտոզոն ցեղի մակարոյժների մոտ: 136 թռչնից վարակված են եղել 99 առանձնյակներ, որոնց թվում 72-ը՝ լեյկոցիտոզոնով: Նուկլեոտիդային հաջորդականությունների վերլուծության արդյունքում հայտնաբերվել են մակարոյժների 35 էվոլյուցիոն զծեր, որոնցից 6 պլազմոդիումի, 4 հեմոպրոտեսուի և 25 լեյկոցիտոզոնի: Գրանցվել է լեյկոցիտոզոնով վարակվածության տարբերություն երկու տեսակների միջև ($P=0.044$), բայց ոչ երկու վայրերի միջև ($P=0.16$, $P=0.76$): Գծային կորելյացիայի կիրառման արդյունքում բացահայտվել է մակարոյժների ֆիլոաշխարհագրական կենտրոնացման բացակայությունը Կովկասի երկու ծայրամասերի միջև՝ $r^2 = 0.6593$, $P = 0.00000003$: Մեր արդյունքներից նաև հետևում է, որ տերերի ավելի լայն սպեկտր ունեցող մակարոյժներն ունեն տեղամասային ավելի բարձր էքստենսիվություն:

Leucocytozoon – ֆիլոաշխարհագրական պարփակում – մակարոյժների բազմազանություն և տարածվածություն

Чтобы полностью понять коэволюцию паразит-хозяин необходимо изучить влияние географической распространенности на экстенсивность инфекции. Используя ПЦР методы, мы исследовали связь обилие – распространение инфекции лейкоцитозоон у двух резидентных видов птиц Кавказа (*Parus major*, *P. caeruleus*). 99 из 136 исследованных птиц были заражены гемоспоридными паразитами, из которых 72 лейкоцитозооном. В результате анализов секвенсов были выявлены 35 гаплотипов, из которых 6 плазмодиума, 4 гемопротеуса и 25 лейкоцитозоона. Нами было зарегистрировано различие зараженности между видами ($P=0.044$), но не между местностями ($P=0.16$, $P=0.76$). Линейная корреляция показала отсутствие филогеографического структурирования между двумя крайними точками Кавказа ($r^2=0.6593$, $P=0.00000003$). Наши результаты показали также связь обилие – распространение у изученных паразитов.

*Лейкоцитозоон – филогеографическое структурирование –
связь обилие – распространение*

To understand host – parasite co-evolution, it is necessary to identify the influence of parasites geographical distribution on their prevalence. Using PCR approach, abundance–occupancy hypotheses for leucocytozoon infections of two resident birds in Caucasus (*Parus major*, *P. caeruleus*) were studied. 99 out of 136 individuals were infected by avian haemosporidians, including 72 leucocytozoon infections. Analysis of the sequences resulted to 35 unique haplotypes, out of which 6 plasmodium, 4 haemoproteus and 25 leucocytozoon. Prevalence of leucocytozoon infection is different among species ($P = 0.044$), but not between the two locations ($P = 0.16$, $P = 0.76$):

Linear correlation of the relative prevalence of lineages between localities revealed a lack of phylogeographic structuring between two terminal parts of Caucasus ($r^2=0.6593$, $P=0.00000003$). Our results showed also abundance–occupancy relationship of leucocytozoon lineages.

Leucocytozoon – Phylogeographical structuring – abundance–occupancy relationship

Մակաբույծ – տեր կոնվոլյուցիան լիարժեքորեն պատկերացնելու համար անհրաժեշտ է բացահայտել մակաբույծների և տերերի աշխարհագրական տարածվածության առանձնահատկությունները [7, 25]: Մակաբույծների մասին հետազոտություններից կարելի է ենթադրել, թե վերջիններս դրսևորում են որոշակի սպեցիֆիկություն որևէ տարածաշրջանի և նրանում տարածված որևէ տիրոջ նկատմամբ [6, 16, 26]: Տարածքին բնորոշ նստակյաց թռչնատեսակների դեպքում կարելի է ենթադրել, որ մակաբույծներն ունեն հնարավորություն պարփակվելու այդ տարածաշրջանում [7]: Իսկ ավելի լայն աշխարհագրական տարածում ունեցող չվող տերերի դեպքում մակաբույծները կարող են նույնպես լայնորեն տարածվել [20]:

Այնուամենայնիվ, իրենց տերերի համեմատությամբ, ավելի քիչ տվյալներ են հայտնի մակաբույծների պոպուլյացիաների գենետիկ կառուցվածքի մասին: Կրիսցիոնի և Բլոուի կողմից ուսումնասիրվել է սաղմոնների նեմատոդները միգրացիայի ժամանակ: Հայտնաբերվել է, որ նեմատոդների այն տեսակները, որոնք մակաբուծում են միայն քաղցրահամ ջրերի սաղմոնների վրա, ունեն գենետիկորեն ավելի պարփակված պոպուլյացիա, քան քաղցրահամ և աղի ջրերում բնակվողների մոտ [4]:

Դրա արդյունքում կարող է ստացվել նաև դրական կոռելյացիա մակաբույծների տերերի լայն սպեկտրի և տարածաշրջանում վարակի բարձր էքստենսիվության միջև: Այս երևույթը էկոլոգիայում կոչվում է վարակի էքստենսիվության և տերերի լայն սպեկտրի կապ [3]: Վերոհիշյալ խնդիրը քննարկելու համար մենք դիտարկում ենք իրադարձությունների զարգացման երկու հնարավոր տարբերակներ.

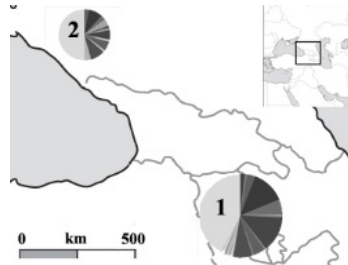
1. Մակաբույծներն առանձնացված են տեղամասերում և վարակում են միայն տեղի թռչնատեսակներին: Այս պարագայում մենք կստանանք բացասական կոռելյացիա տարբեր տեղամասերում մակաբույծների բազմազանության և հանդիպման հաճախականությունների միջև:

2. Մակաբույծները տարածաշրջաններում պարփակված չեն, և տերերի ավելի լայն սպեկտր ունեցող տեսակների մոտ վարակի էքստենսիվությունը տարբեր տեղամասերում ավելի բարձր կստացվի:

Այս երկու հիպոթեզները մանրամասնորեն քննարկվել են Ջենկինսի և Օուենսի կողմից 2011թ: Նրանք ուսումնասիրել են Եվրոպայի մի շարք վայրերում լեյկոցիտոգոն ցեղի մակաբույծների պոպուլյացիաների առանձնահատկությունները թռչունների 2 նստակյաց տեսակների մոտ (*Parus major*, *P. caeruleus*): Կիրառելով կրկնակի PCR [13]՝ նրանք բացահայտել են 88 վարակված թռչուն 345 հետազոտվածից և լեյկոցիտոգոնի 14 էվոլյուցիոն գծեր: Արդյունքում նրանք բացառել են որևէ տեղամասում լեյկոցիտոգոնի գենետիկական պարփակումը և հանգել այն եզրակացությանը, որ տերերի ավելի լայն սպեկտր ունեցող մակաբույծներն ունեն նաև վարակի բարձր էքստենսիվություն տարբեր տեղամասերում [14]: Մակայն, ինչպես գիտենք, Եվրոպայի թռչունները կազմում են մի ամբողջական համակարգ, քանի որ գրեթե բացակայում են թռչունների՝ միմյանց միջև փոխազդեցությունը խոչընդոտող արգելքները: Եվ այս պարագայում պարզ է դառնում, որ մակաբույծների պարփակումը որևէ տարածաշրջանում խիստ անհավանական է: Այդ իսկ պատճառով մենք որոշեցինք ստուգել վերոհիշյալ հիպոթեզները աշխարհագրական այլ վայրում, որտեղ բարձր լեռները կարող են խոչընդոտել տերերի և մակաբույծների սերտ փոխհարաբերությանը:

Այսպիսով, այս հետազոտության նպատակն է եղել պարզել թռչունների արյան սպորավոր մակաբույծներից լեյկոցիտոգոն ցեղի մոտ տարածքային պարփակման հնարավորությունը և սպեցիֆիկությունը Կովկասի երկու ծայրամասերում՝ Հայաստանում և հյուսիսարևմտյան Կովկասում, ինչպես նաև ստուգել «Տերերի լայն սպեկտր – վարակվածության բարձր էքստենսիվություն» կապը մեր տարածաշրջանում:

Նյութ և մեթոդ: 2010 և 2011 թթ. ընթացքում շուրջ 131 թռչնի նմուշ է (*Parus caeruleus*-47, *P. major*-84) հավաքվել Հայաստանի և հյուսիսարևմտյան Կովկասի անտառային վայրերից (նկ. 1):



Նկ. 1. Նմուշի հավաքման վայրերը և լեյկոցիտոգոնով վարակվածության գրաֆիկական պատկերը: 1-Հայաստան, 2-Հյուսիսարևմտյան Կովկաս: Շրջանակների մակերեսները համեմատական են նմուշների քանակին, իսկ երանգները՝ հայտնաբերված էվոլյուցիոն գծերի քանակին

Թռչունները բռնվել են ցանցերի միջոցով, նրանցից վերցվել է արյուն, որը մինչ լաբորատոր հետազոտությունների իրականացումը պահվել է էթանոլի 96%-անոց լուծույթում: Թռչունները նաև օդակավորվել են բաց թողնվելուց առաջ՝ նույն առանձնյակի կրկնակի որսը բացառելու համար: Լաբորատորիայում արյան նմուշներից անջատվել է ԴՆԹ-ն՝ թռչնի և առկայության դեպքում՝ մակաբույծների: ԴՆԹ անջատման համար օգտագործվել է Qiagen Dneasy extraction kit (Qiagen Corporation)՝ ըստ արտադրողի ցուցումների: Կիրառվել է ՊՇՌ մեթոդը՝ նույնականացնելու համար մակաբույծների միտոքոնդրիոմային ցիտոքրոմ b գենի 505 bp երկարությամբ հատվածը: ՊՇՌ իրականացման համար օգտագործվել են Ս.Վ. Դրովեցկու կողմից նախագծված 3 զույգ պրայմերները՝ 1 առաջնային (UNIV-F) և 3 հետին (UNIV-R, UNIV-R2, UNIV-R3) (Դրովեցկի-անհատական հաղորդակցություն): Որպես լրացուցիչ միջոց օգտագործվել են ավելի լայն կիրառություն ունեցող 1 զույգ պրայմերներ՝ HAEMN-F և HAEMN-R2 [2]:

ՊՇՌ-ն կատարվել է հետևյալ պայմաններով. 94°C՝ 3 ր, ապա ցիկլիկ շրջան՝ 30 վայրկյան – 94°C, 30 վայրկյան – 51°C C, և 45 վայրկյան 72°C 41 ցիկլերով, որից հետո 72°C 10 ր: 12,5 քլ ռեակցիայի լուծույթը պարունակել է 2 քլ անջատված ԴՆԹ-ից, 0,24 μM յուրաքանչյուր պրայմերից, 1x of GoTaq® Flexi Buffers, 0,287 mM dNTP, 2 mM MgCl2, 5,978 μl H2O և 1,2 միավոր՝ Taq ԴՆԹ պոլիմերազա (Promega Corporation): Դրական նմուշները երևակելու համար կատարվել է էլեկտրոֆորեզ 2 %-անոց ագարոզային գելի վրա, արդյունքները դիտվել են ՈւՄ ճառագայթների տակ: Դրական արդյունք ցույց տված նմուշները մաքրվել են՝ օգտագործելով ExoSAP-IT PCR Clean-up Kit (USB Corporation) և ուղարկվել են Macrogen (Macrogen corporation-Netherlands) նուկլեոտիդային հաջորդականության որոշման համար: Հաջորդականությունները մշակվել են BioEdit ծրագրով [10], իսկ հապլոտիպերը որոշվել են DNAsp 5 ծրագրով [18]: Հապլոտիպերի պատկանելիությունը այս կամ այն մակաբույծի տեսակին պարզելու համար դրանք համեմատվել են գենների միջազգային բանկում և MalAvi բազայում [1] առկա հաջորդականությունների հետ: Մակաբույծների ազգակցական կապերի որոշման համար կառուցվել է ֆիլոգենետիկ ծառ (նկ. 2)՝ օգտագործելով Neighbor-Joining մեթոդը [23] և կիրառելով MEGA5 ծրագիրը [24]: Էվոլյուցիոն հեռավորությունները հաշվարկվել են՝ օգտագործելով p-distance մեթոդը [22]: Տվյալների վիճակագրական վերլուծության համար կիրառվել է Fisher's exact test, որոշվել են տվյալների համեմատության P արժեքները: Հայաստանում և հյուսիսարևմտյան Կովկասում լեյկոցիտոգոնի գծերի համեմատական տարածվածությունները համեմատելու համար կառուցվել է գծային կոռելյացիայի կորը (նկ. 3): Հարաբերական վարակվածությունը (հանդիպման հաճախություն) հաշվարկվել է՝ օգտագործելով հետևյալ բանաձևը.

Լեյկոցիտոգոնի հանդիպման հաճախություն=
(տվյալ գծով վարակվածների թիվը տվյալ վայրում)
(տվյալ վայրում հայտնաբերված նուկլեոտիդային հաջորդականությունների թիվ)

Արդյունքներ և քննարկում: Ուսումնասիրված 131 թռչուններից 99-ը վարակված են եղել արյան սպորավորներով (աղ. 1), որոնցից 22-ը՝ պլազմոդիումով, 32-ը՝ հեմոպրոտեոսով և 72-ը՝ լեյկոցիտոգոնով (թվերի գումարը ստացվում է ավելի մեծ, քան վարակվածների թիվն է, քանի որ առկա են մեծ քանակությամբ առանձնյակներ, որոնք վարակված են միանգամից 2 և ավելի գծերով): Ընդհանուր առմամբ 64 նմուշ կրում է կրկնակի վարակ, այդ թվում՝ 13-ում առկա էին 3 և ավելի գծեր:

Աղ. 1. Լեյկոցիտոզոոնով վարակվածների քանակը Հայաստանում
և հյուսիսարևմտյան Կովկասում

Տեսակներ	N	N _{inf}	Le	N _A	N _{ALe}	N _R	N _{RLe}
<i>Parus major</i>	84	71	52	53	36	31	16
<i>Parus caeruleus</i>	47	28	20	32	13	15	7
Ընդհանուր	131	99	72	85	49	46	23

N-ուսումնասիրված թռչունների քանակը, N_{inf}-ընդհանուր վարակվածների թիվը, Le-լեյկոցիտոզոոնով վարակվածների թիվը, N_A-ուսումնասիրված թռչունների քանակը Հայաստանում, N_{ALe}-Հայաստանում լեյկոցիտոզոոններով վարակվածների թիվը, N_R-ուսումնասիրված թռչունների քանակը հյուսիսարևմտյան Կովկասում, N_{RLe}- հյուսիսարևմտյան Կովկասում լեյկոցիտոզոոններով վարակվածների թիվը:

Նուկլեոտիդային հաջորդականությունների վերլուծության արդյունքում հայտնաբերվել են մակաբույծների 35 էվոլյուցիոն գծեր, որոնցից 6-ը՝ պլազմոդիումի, 4-ը՝ հեմոպրոտեուսի և 25-ը՝ լեյկոցիտոզոոնի (նկ. 2):



Նկ. 2. Հայտնաբերված մակաբույծների հապլոտիպերի ֆիլոգենետիկ ծառը: Սյունակներում ներկայացված են համեմատական վարակվածության մակարդակները Հայաստանում (A) և հյուսիսարևմտյան Կովկասում (R): *-Այս հապլոտիպերը հանդիպում են նաև Եվրոպայի տարբեր վայրերում միևնույն տեսակի թռչունների մոտ [14]:

Համեմատվել են լեյկոցիտոզոոնով վարակվածության մակարդակները Հայաստանի և հյուսիսարևմտյան Կովկասի միջև (աղ.1), ինչպես նաև Հայաստանում և հյուսիսարևմտյան Կովկասում տարբեր տեսակների միջև (աղ. 2): Ընդհանուր առմամբ լեյկոցիտոզոոնով վարակվածների մակարդակը հավաստիորեն ավելի բարձր է *P.major*-ի մոտ, քան *P.caeruleus*-ի ($P=0.044$): Սակայն Հայաստանի և հյուսիսարևմտյան

Կովկասի թռչունների միջև լեյկոցիտոզոոնով վարակվածության մակարդակները միմյանցից չեն տարբերվում (աղ. 2): Հավաստիորեն տարբերվում են միայն Հայաստանում *P. major* և *P. caeruleus*-ի մոտ վարակվածության ինտենսիվությունները:

Աղ. 2. Լեյկոցիտոզոոնով վարակվածության համեմատությունը Հայաստանում և հյուսիսարևմտյան Կովկասում

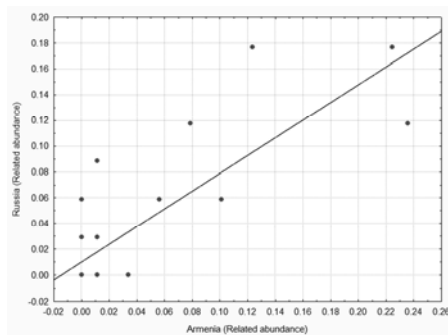
LeArm/Rus	<i>P. major</i>	<i>P. caeruleus</i>
<i>P. major</i>	P=0,16	P=1
<i>P. caeruleus</i>	P=0,023	P=0,76

Անկյունագծով տրված են Հայաստանի և հյուսիսարևմտյան Կովկասի վարակվածության մակարդակների համեմատության արդյունքները: Անկյունագծից վերև հյուսիսարևմտյան Կովկասում և ներքև՝ Հայաստանում երկու տեսակների վարակվածության համեմատությունները:

Լեյկոցիտոզոոնի գծերից տարածաշրջանում առավել շատ տարածված են Hap-4-ը (IPARUS4)՝ 26 վարակված առանձնյակներով (*P.caeruleus*-3, *P.major*-23) և Hap-12-ը (Ge003)՝ 25 վարակվածներով (*P.caeruleus*-1, *P.major*-24):

Հաշվարկվել են լեյկոցիտոզոոնի հայտնաբերված գծերի համեմատական վարակվածության աստիճանները Հայաստանում և հյուսիսարևմտյան Կովկասում (նկ. 2):

Համեմատելու և պարզելու համար ,Տերերի լայն սպեկտր – վարակվածության բարձր էքստենսիվություն է կապը Հայաստանի և հյուսիսարևմտյան Կովկասի միջև՝ կառուցվել է համեմատական վարակվածության արժեքների գծային կոռելյացիան (նկ. 3): Այս երկու վայրերի միջև լեյկոցիտոզոոնի գծերով վարակվածության համեմատությունը ցույց է տվել մոտ 66% նմանություն ($r^2 = 0.6593$), ինչը նաև ունի հավաստիության բարձր գործակից ($P=0.00000003$): Ընդ որում հաշվի է առնվել ինչպես գծերի առկայությունը երկու վայրերում, այնպես էլ դրանցով վարակվածության մակարդակները:



Նկ. 3. Հայաստանում և հյուսիսարևմտյան Կովկասում լեյկոցիտոզոոնի գծերի հարաբերական տարածվածության արժեքների գծային կոռելյացիան

Ստացված արդյունքները վկայում են այն մասին, որ ուսումնասիրված տեսակների լեյկոցիտոզոոնի մոտ բացակայում է ֆիլոաշխարհագրական կենտրոնացումը (պարփակումը Կովկասում): Մեր արդյունքները համահունչ են «Տերերի լայն սպեկտր – վարակվածության բարձր էքստենսիվություն» կապին [3, 8, 9, 11]: Այստեղից կարելի է ենթադրել, որ տերերի նկատմամբ սպեցիֆիկությունը, թռչունների չվելու ունակությունը, տարբեր վայրերում միջատների առկայությունը կարող են ազդեցություն ունենալ մակարդակների բազմազանության վրա տվյալ տեղամասում: Մեր արդյունքները նաև ցույց են տալիս, որ տերերի լայն սպեկտր ունեցող մակարդակները ունեն ավելի շատ քանակությամբ առանձնյակներ վարակելու հնարավորություն (նկ. 2):

Վերջերս հրատարակված Ջենկինսի և Օուենսի աշխատանքը վերաբերում է Եվրոպայի մի շարք վայրերում լեյկոցիտոզոն ցեղի մակաբույծների ֆիլոաշխարհագրական պարփակմանը 2 նստակյաց տեսակների մոտ (*Parus major*, *P. caeruleus*): Ցավոք, նրանց հետազոտությունում օգտագործել են այլ պրայմերներ, ինչպես նաև հետազոտության մեջ չեն ընդգրկել կրկնակի վարակ կրող առանձնյակները, ինչը թույլ չի տալիս համեմատել մեր և նրանց տվյալները և ստուգել մակաբույծների ֆիլոաշխարհագրական կենտրոնացումը Կովկասի և Եվրոպայի միջև: Մեր հետազոտությունում լեյկոցիտոզոնով վարակվածության էքստենսիվությունը կազմել է մոտ 55% (n=72) նրանց 25.5%-ի (n=88) դիմաց: Կրկնակի վարակվածների թվով ևս նշված աշխատանքը զիջում է մեր ստացած ցուցանիշներին: Տարբեր են նաև ստացված մակաբույծների բազմազանությունները՝ մեր մոտ լեյկոցիտոզոնի 25 գծի փոխարեն նրանց մոտ հայտնաբերվել են ընդամենը 14-ը [14]: Ինչպես Եվրոպայում, Կովկասում ևս ամենատարածված գիծը հանդիսանում է IPARUS4-ը: Երկրորդ տեղում մեզ մոտ Ge003 գիծն է, իսկ Եվրոպայում՝ C105 գիծը: Վերջինս մեզ մոտ հանդիպում է միայն 1 առանձնյակի մոտ:

Ստացված տարբերությունները իհարկե թույլ կտալին ենթադրել մակաբույծների ֆիլոաշխարհագրական կենտրոնացման մասին այս երկու տարածաշրջանների համար, սակայն դրանք կարող են լինել օգտագործված պրայմերների զգայունությունների տարբերության արդյունք:

Չնայած մեր արդյունքները բացառում են մակաբույծների տեղանքային աղապտացիան, այնուամենայնիվ, մակաբույծների՝ տեղանքին հարմարվելու ունակությունն ապացուցվել է նույնիսկ տերերի պոպուլյացիաների չնչին գենետիկ տարբերության պարագայում [15]: Եթե թռչունների չուն էական դեր ունի մակաբույծների տարածվածության և բազմազանության մեջ, ապա աշխարհագրական պարփակում հնարավոր կլինի միայն այն դեպքում, եթե մակաբույծը սպեցիֆիկ է որևէ տարածաշրջանի բնորոշ տեսակի նկատմամբ: Օրինակ, ցույց է տրվել, որ *Plasmodium relictum*-ը գենետիկորեն տարբերվում է *Passer domesticus*-ի տարբեր պոպուլյացիաներում [19]:

Վեկտորների լայն սպեկտրի առկայությունը ևս կարող է մեծ դեր խաղալ մակաբույծների տարածման համար: Սակայն հետազոտություններից հայտնի է, որ լեյկոցիտոզոնի վեկտոր հանդիսացող միջատները դրսևորում են որոշակի սպեցիֆիկություն տերերի նկատմամբ [21], և մոտ ազգակից գծերը փոխանցվում են մոտ ազգակից տեր տեսակների և վեկտորների միջև [12]: Վեկտորի միգրացիան ևս կարող է ազդել մակաբույծի տարածման վրա: Ընդունված է, որ վերոհիշյալ միջատների թռիչքն ընդգրկում է 150-300 կմ, սակայն նշադրմամբ բացահայտվել է նրանց թռիչքի հեռավորությունը մինչև 15 կմ շառավղով [5]: Վեկտորների միգրացիայի դերը մակաբույծների տարածման գործում պարզելու համար հետազոտում անհրաժեշտ է կատարել ավելի խորը ուսումնասիրություններ:

Հաշվի առնելով մակաբույծների բազմազանությունը, նրանց էկոլոգիան և կենսական ցիկլը՝ առավել շատ հետազոտություններ են անհրաժեշտ նրանց պոպուլյացիոն գենետիկ կառուցվածքը հասկանալու համար: Հատկապես հետաքրքիր կլինի պարզել, թե տերերի կամ վեկտորների շարժունակությունն ինչպե՞ս է ազդում մակաբույծների պոպուլյացիաների միջև գենետիկական նյութի փոխանցման վրա: Գենետիկական տվյալները կարող են նպաստել նաև մակաբույծների վերարտադրողական ռազմավարությունների բացահայտման գործին [20]: Եվ, վերջապես, Տերերի լայն սպեկտր – վարակվածության բարձր էքստենսիվությունն կապի և մակաբույծների տարածքային հարմարվողականության համադրումը էվոլյուցիայի ընթացքում շատ կարևոր խնդիր է, ուստի հետագա խորը հետազոտություններ են անհրաժեշտ էվոլյուցիոն այս հանելուկը բացահայտելու համար:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. Bensch S., O. Hellgren, et al. MalAvi: a public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome b lineages. Molecular Ecology Resources, 9, 1353-1358, 2009.
2. Bensch S., M. Stjernman, et al. Host specificity in avian blood parasites: a study of *Plasmodium* and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified from birds. The Royal Society, 267, 1452, 1583-1589, 2000.

3. Brown, J. On the relationship between abundance and distribution of species. *American Naturalist* 124, 255–279, 1984.
4. Criscione, C.D., Blouin M.S. Life cycles shape parasite evolution: comparative population genetics of salmon trematodes. *Evolution*, 58, 198–202, 2004.
5. Crosskey, R.W. The Natural History of Blackflies, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 1990.
6. Ebert, D. Virulence and local adaptation of a horizontally transmitted parasite. *Science*, 265, 1084, 1994.
7. Fallon, S.M., R.C. Fleischer, et al. Malarial parasites as geographical markers in migratory birds? *Biology Letters*, 2, 2, 213–216, 2006.
8. Freckleton, R.P., Noble D., et al. Distributions of habitat suitability and the abundance–occupancy relationship. *American Naturalist* 167, 260–275, 2006.
9. Gaston, K.J., Blackburn T.M., et al. Abundance–occupancy relationships. *Journal of Applied Ecology*, 37, 39–59, 2000.
10. Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98, 1999.
11. Hanski, I. Dynamics of regional distribution – the core and satellite species hypothesis. *Oikos*, 38, 210–221, 1982.
12. Hellgren, O., Bensch S., et al. Bird hosts, blood parasites and their vectors; associations uncovered by molecular analyses of blackfly blood meals. *Molecular Ecology*, 17, 1605–1613, 2008.
13. Hellgren, O., Waldenström J., et al. "A New PCR Assay for Simultaneous Studies of Leucocytozoon, Plasmodium, and Haemoproteus from Avian Blood. *The Journal of parasitology*, 90, 4, 797–802, 2004.
14. Jenkins, T., Owens I.P.F. Biogeography of avian blood parasites (Leucocytozoon spp.) in two resident hosts across Europe: phylogeographic structuring or the abundance–occupancy relationship? *Molecular Ecology*, 20, 18, 3910–3920, 2011.
15. Jokela, J., Dybdahl M., et al. The maintenance of sex, clonal dynamics, and host–parasite coevolution in a mixed population of sexual and asexual snails. *American Naturalist*, 174, 543–553, 2009.
16. Koskella, B., Lively C. Advice of the rose: experimental coevolution of a trematode parasite and its snail host. *Evolution*, 61, 152–159, 2007.
17. Laine A. Temperature-mediated patterns of local adaptation in a natural plant–pathogen metapopulation. *Ecology Letters*, 11, 327–337, 2008.
18. Librado, P., Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451–1452, 2009.
19. Loiseau, C., Zoorob R., et al. "Plasmodium relictum infection and MHC diversity in the house sparrow (Passer domesticus)." *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 278, 1264–1272, 2011.
20. Louhi, K.-R., Karvonen A., et al. Is the population genetic structure of complex life cycle parasites determined by the geographic range of the most motile host? *Infection, Genetics and Evolution*, 10, 8, 1271–1277, 2010.
21. Malmqvist, B., Strasevicius D., et al. Vertebrate host specificity of wild-caught blackflies revealed by mitochondrial DNA in blood. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 271, 4, S152–S155, 2004.
22. Nei M., Kumar S. Molecular evolution and phylogenetics. Oxford, Oxford University Press, 2000.
23. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406–425, 1987.
24. Tamura K., Peterson D., et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 2011.
25. Thompson J. The Geographic Mosaic of Coevolution. The University of Chicago Press. London, Chicago, IL, 227–245, 2005.
26. van Valen, L. The Red Queen. *American Naturalist*, 111, 809–810, 1977.

Մտածվել է 11.05.2012



Биолог. журн. Армении, 1 (65), 2013

ТВЕРДОФАЗНЫЙ СИНТЕЗ КАРДИОАКТИВНОГО ПЕПТИДА, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ПРЕДСЕРДИЙ СВИНЬИ

Г.С. ЧАИЛЯН

Институт биохимии им. Бунятына НАН РА
samvelch@yahoo.com.

В целях продолжения исследований акад. Галояна, нами был проведен ряд экспериментов по выделению, очистке и определению биологической направленности нововыделенных соединений пептидной природы из предсердий и ушковых частей сердца свиньи. Для проведения биотестов требовалось получить препаративные количества исследуемых образцов. Для этого мы воспользовались методикой твердофазного синтеза пептидов с ее дальнейшей модификацией. Чистота и идентичность синтезированных препаратов проверялись методами высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрального анализа.

*Твердофазный синтез – fmoc-аминокислоты – ВЭЖХ – фенилизотиоцианат –
масс-спектральный анализ*

Ավադեմիկոս Գալոյանի հետազոտությունների շարունակման նպատակով կատարվել են փորձեր խոզի նախասրտերից անջատած պեպտիդային բնույթի միացությունների մաքրման և կենսաբանական ուղղվածության որոշման համար: Կենսաթեստերի իրականացման համար անհրաժեշտ նմուշների պրեպարատիվ քանակներ ստանալու նպատակով օգտագործվել է պեպտիդային սինթեզի պինդ ֆազային ձևափոխված եղանակ: Սինթեզված նմուշների մաքրությունն ու իսկությունը ստուգվել է բարձր արդյունավետության հեղուկային քրոմատոգրամիայի և մասս-սպեկտրալի վերլուծության մեթոդներով:

*Պինդ ֆազային սինթեզ – բարձր էֆեկտիվության հեղուկային քրոմատոգրաֆիա – մասս
սպեկտրոմետրիա – fmoc-ամինաթթուներ – կարդիոպեպտիդներ – նախասրտեր*

For further studies established by Galoyan, a series of experiments on the isolation, purification and determination of biological direction of peptides isolated from pigs atria were carried out. For fulfilling the biotests the preparative amount of samples was required. A modified method of solid phase peptide synthesis was used. The synthesized peptide purity and identity were defined by HPLC and mass-spectral analysis.

*Solid phase synthesis – high performance liquid chromatography – mass spectrometry –
fmoc-aminoacids – cardiopeptides – atria*

В течение многих лет в Институте биохимии НАН РА в отделе биохимии нейrogормонов акад. Галояном с сотрудниками изучались пути регуляции и механизмы действия гипоталамических нейrogормонов на различные процессы в организме [5].

Подтверждение идеи о взаимосвязанном, взаимообусловленном, цельном функционировании такой системы, как гипоталамус – гипофиз – надпочечники, явилось переломным моментом в эндокринологии. Пополнение же этой концеп-

туальной триады, выдвинутой Галояном относительно взаимодействия гипоталамус - гипофиз – сердце, является огромным научным достижением. Впоследствии была обнаружена новая ткань-мишень-сердце, показана способность этого органа управлять функционированием специфических пептидов, а также существование механизма обратной связи между гипоталамусом и сердцем посредством этих пептидов[4].

Обнаружение кардиоактивных соединений – нейрогормона К, С, G и ряд других в гипоталамусе различных животных послужило началом работ не только по изучению молекулярных механизмов действия этих нейрогормонов, но и по поиску подобных соединений в сердце [6]. Основанием для всестороннего исследования биохимических и физико-химических свойств кардиоактивных начал послужили данные о наличии 2-х кардиоактивных соединений в сердечной мышце [7]. Было установлено участие нейрогормона “С” в регуляции гликолитических процессов и уровня циклических нуклеотидов посредством ингибирования ФДЭ цАМР, цАМФ- зависимой протеинкиназы и т.д. Было показано, что это соединение является низкомолекулярным и относится к гликопептидам [8].

Нами в лаборатории аналитической хроматографии и пептидного синтеза была проведена работа по выделению и очистке соединений пептидной природы из предсердий и ушковых зон сердца свиньи [9]. При разделении пептидных фракций препаративной ВЭЖХ, нами были выделены и очищены до гомогенного состояния 20 соединений пептидной природы [1]. Для определения биологической направленности все препараты были тестированы на изменения компонентов ЭКГ у крыс [10]. Результаты экспериментов показали, что 7 соединений имеют разносторонние факторы влияния на определенные компоненты ЭКГ. Пептид №7 показал наибольшую активность на изменение амплитуды компонента R, длительности комплекса QRS, амплитуды S и других параметров.

Для изучения биологических механизмов действия данного препарата стало необходимо наличие большого количества исследуемого образца. Ввиду того, что процесс выделения и очистки биопрепаратов является крайне неэффективным, трудоемким, времязатратным и не может обеспечивать хорошей воспроизводимости, стало крайне актуальным проведение химического синтеза данного препарата. Анализируя мировую литературу в области химического синтеза пептидов, мы пришли к выводу, что наиболее оптимальным для нас является методика твердофазного синтеза с использованием fmoc-защищенных аминокислот. Открытый в 1984 году твердофазный синтез пептидов (Solid phase peptide synthesis) имеет много преимуществ по сравнению с обычным синтезом с точки зрения эффективности, а также удобной обработки и очистки [1].

С использованием несколько различных методик: гидролиза данного препарата, модифицирования аминокислот фенилизотиоцианатом, нами был получен аминокислотный состав пептида №7[2]. Используя данные масс-спектрального и ЯМР-анализов, эдмоновской деградации, нам удалось получить не только аминокислотный состав, но также аминокислотную последовательность пептида №7.

Phe – Val – Pro – Ala – Met – Gly – Ile – Arg – Pro

Эффективный процесс твердофазного синтеза во многом зависит от правильного выбора различных условий его проведения, таких как выбор смолы, растворителя и кинетики проведения синтеза [3]. Эти переменные влияют на степень набухания смолы и связи ее с аминокислотами, количеству связывающих сайтов, что в конечном итоге влияет на синтез пептида в целом. Мы приспособили процесс твердофазного синтеза по отношению к нашим исследуемым пептидам с учетом особенностей их аминокислотной последовательности.

Материал и методика. Все использованные реактивы, растворители, смолы фирмы “Advanced Chem Techcompany”. Мы использовали fmoc-группы для защиты N-концов аминокислот в процессе синтеза и диметилформамид (DMF) как растворитель в процессе всего синтеза. В качестве подложки мы использовали кислотолабильную 2-хлортритильную смолу. Снятие защитных fmoc-групп проводилось с помощью раствора пиперидина в DMF.

Очень важным в процессе синтеза является посадка первой аминокислоты на смолу. Два грамма 2Cl-Trt-й смолы насыпали в шприц объемом 10 мл. Набирали DMF в шприц, давали набухнуть смоле в течение 15 мин. После этого DMF вымывался. Затем в шприц набирался раствор первой аминокислоты (fmoc-Pro) и активатор реакции (DIPEA) в соотношении $1_{\text{смолы}}/1,2_{\text{FMOC-PRO}}/4_{\text{DIPEA}}$. Реакция посадки первой аминокислоты шла 3 ч. Очень важным условием проведения синтеза является отсутствие свободных линкероов после посадки первой аминокислоты, поэтому смолу после связывания с первой аминокислотой обрабатывали смесью метилена, DIPEA (диизопропилэтиламин) и DMF в соотношении $80_{\text{DMF}}/15_{\text{МЕОН}}/5_{\text{DIPEA}}$ для блокирования возможно оставшихся свободных концов. После этого промывали смолу DMF 5 раз по 5 мин. Затем проводили деблокирование аминокислот 30%-ным раствором пиперидина в DMF 8 раз по 5 мин. После этого смолу промывали DMF 5 раз по 5 мин. Этот цикл повторялся в течение всего синтеза пептида. После каждого шага присоединения и деблокирования аминокислот контроль хода реакции проверялся Кайзер тестом, что представляет собой реакцию нингидрина со свободной аминогруппой с образованием характерного темно-синего цвета. Благодаря этому тесту, стал возможным пошаговый контроль реакций посадки и деблокирования аминокислот.

Очистка и контроль синтезированного пептида № 7 были проведены на 2-х компонентной препаративной системе ВЭЖХ фирмы Waters (USA). Для ввода образца использовался инжектор Rheodyne с объемом петли 500 мкл. Детектирование проводилось в диапазоне 190-360 нм. Мы использовали колонку “Symmetry Si-100 C18” (4,6x250 mm) для обращенно-фазовой ВЭЖХ. Скорость потока была 50 мл/мин. Использовалась градиентная система элюента $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}/\text{TFA}$ (98/2/0.1) / (0.100.0.1). Время анализа 15 мин. Рехроматографию проводили на аналитической системе Knauer HPLC. Использовалась колонка X-bridgeC18 (2.6x150 mm). Детектирование проводили при 214 нм.

Для подтверждения полученных данных синтезированный препарат был подвергнут масс-спектральному анализу на CSU “Analytical spectrometry”.

Результаты и обсуждение. Данные, полученные на хроматограмме, позволяют утверждать, что чистота синтезированного пептида №7 после очистки составляет более 99,6% (рис.1).

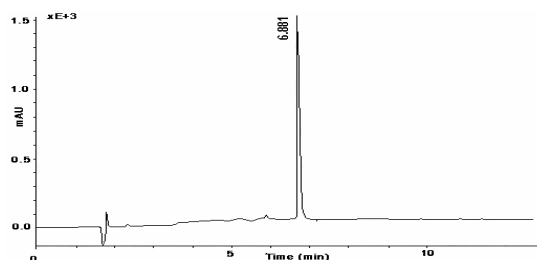


Рис. 1. Хроматограмма синтезированного и очищенного пептида №7. Колонка X-bridgeC18 (2.6x150 mm). Детектирование 214 нм.

Нами был проведен сравнительный хроматографический анализ нативного пептида №7 на колонке X-bridgeC18 в тех же условиях, что и его синтезированный аналог. Результаты сравнения представлены (рис. 2).

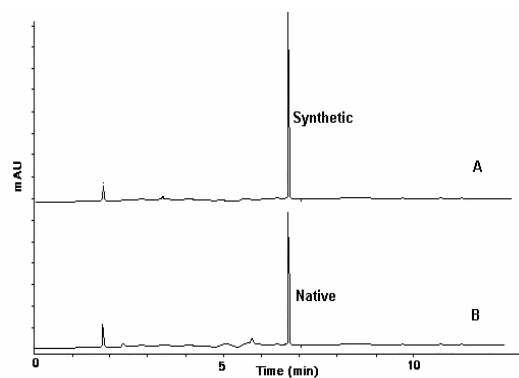


Рис. 2. Хроматограммы синтезированного (А) и нативного (В) пептидов. Колонка X-bridgeC18 (2.6x150 mm). Элюенты : H₂O/ACN/TFA (98/2/0.1). Детектирование при 214 нм. Условия градиента одинаковы для обеих хроматограмм.

Далее мы получили данные масс-спектрального анализа для синтезированного препарата (рис. 3) и сравнили его спектр со спектром нативного пептида. Результаты сравнения приведены (рис. 4).

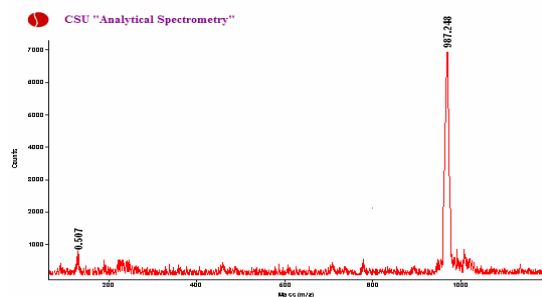


Рис. 3. Спектрограмма синтезированного препарата №7

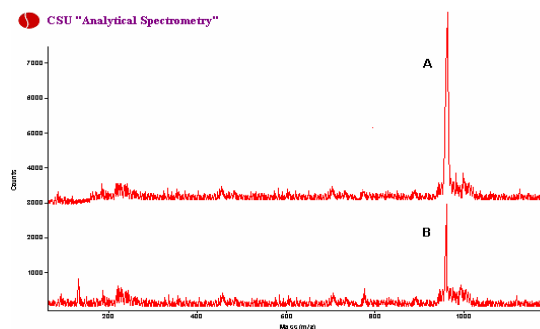


Рис. 4. Спектрограммы синтезированного (А) и нативного (В) препаратов.

Как видно из сравнения хроматограмм, синтезированный аналог и нативный пептид № 7 одинаковы по массе и времени выхода, что говорит об идентичности их структур и аминокислотной последовательности. Таким образом, используя метод твердофазного синтеза пептидов и учитывая особенности строения исследуемого пептида, нам удалось получить гомогенный и идентичный нативному пептид, состоящий из 9 аминокислот. В дальнейшем, имея достаточное количество препарата, мы планируем провести ряд биотестов по выявлению не только путей регуляции сердечной деятельности этим пептидом, но также механизмов действия на другие органы и системы.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Попова Т.В., Срапионян Р.М., Галоян А.А.* Обнаружение и идентификация в сердце быка новых кардиоактивных белков. *Вопр. мед. химии*, 37, 2, с. 56-58, 1991.
2. *Срапионян Р.М., Саакян С.А., Саакян Ф.М., Галоян А.А.* Выделение и характеристика кардиоактивного триптического фрагмента белка-носителя нейрогормона "С". *Нейрохимия*, 2, 3, с. 263-271, 1983.
3. *Срапионян, Р.М. Мисирян, С.С.* Разделение низкомолекулярных коронароактивных соединений сердечной мышцы сочетанием методов гелевой фильтрации и электрофореза в полиакриламидном геле. *Биолог. журн. Армении*, 27, 10, 102-104, 1974.
4. *Срапионян, Р.М. Попова, Т.В. Галоян, А.А.* Распределение кардиоактивных белковых комплексов в сердце различных животных. *Биолог. журн. Армении*, 40, 7, 588-590, 1987.
5. *Galoyan A.* The Regulation of Neurosecretion and Hormones of Hypothalamo-Neurohypophyseal System, USSR, 1963.
6. *Galoyan A.A.* Biochemistry of Novel Cardioactive Hormones and Immunomodulators of the Functional System Neurosecretory Hypothalamus, Endocrine Heart. Nauka Publ. p. 240, 1997.
7. *Galoyan A.A., Besedovsky H.* Handbook of Neurochemistry and molecular Neurobiology, 3rd edition, Springer Publishers, 500 p., 2008.
8. *Galoyan A.A., Brain Neurosecretorycytokins: Immune Response and Neuronal Survival*, VIII, 188 p., 2004.
9. *Galoyan A.A., Srapionyan R.M.* The purification of coronarodilatory proteins isolated from the hypothalamus. *Dokl. Akad. NaukArm.SSR*, 42, 4, p. 210-213, 1966.
10. *March J., Smith M.* March's advanced organic chemistry. Published by John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, p. 133, 2007.

Поступила 07.02.2013



Биолог. журн. Армении, 1 (65), 2013

РОЛЬ ХРОНИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ОБРАЗОВАНИИ ОПУХОЛИ И ПРОГРЕСС В ПОНИМАНИИ МЕХАНИЗМОВ МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ

Д. СЕВУМЯН², Н. АМБАРЦУМЯН¹, М. ГРИГОРЯН¹

¹Датский институт биологии рака; Институт неврологии и фармакологии
Университета Копенгагена (Дания);

²Центр медицинской генетики и первичной охраны здоровья (Ереван, Армения)
lion8-11@mail.ru

Ранее была показана повышенная продукция белка S100A4 в поврежденных тканях и плазме крови пациентов, страдающих злокачественным заболеванием, а также при провоспалительном этапе метастазирования опухоли. Тем не менее роль белка S100A4 в процессе воспаления остается неизвестной. В работе представлены результаты, объясняющие предполагаемую связь белка S100A4 с воспалением на модели прогрессии опухоли. Полученные данные предполагают, что хроническое воспаление, опосредованное с белком S100A4, может содействовать процессу метастазирования, и таким образом провоспалительные пути развития как мишени лечения могут быть эффективными способами для борьбы против метастаз.

Хроническое воспаление – метастазирование – S100A4

S100A4-ը մետաստազի գործընթացը խթանող գեն է, որի էքսպրեսիան կապակցված է քրոնիկ բորբոքման, իսկ սպիտակուցի բարձր էքսպրեսիան հիվանդի վնասված հյուսվածքներում և պլազմայում՝ քաղցկեղի առաջացման հետ, ինչպես նաև նախաբորբոքային փուլում ուռուցքային մետաստազի ժամանակ: Այնուամենայնիվ, այդ սպիտակուցի դերը բորբոքային գործընթացում դեռ մնում է անհայտ: Ներկայացված արդյունքները բացատրում են ենթադրվող կապը S100A4 սպիտակուցի և բորբոքային գործընթացի միջև զարգացող ուռուցքային մոդելներում: Հետազոտվել է S100A4 սպիտակուցի մասնակցությունը մարդու քրոնիկ բորբոքային խանգարումների ժամանակ և բացահայտել S100A4-ի ներգրավման մոլեկուլային մեխանիզմները բորբոքային գործընթացի հետ կապակցված, մասնավորապես ուռուցքի զարգացման ընթացքում (մետաստազ): Եզրակացնելով կարելի է ասել, որ S100A4 սպիտակուցի միջնորդումը քրոնիկ բորբոքման ժամանակ նպաստում է մետաստազների ձևավորմանը, այդպիսով՝ համարվելով բուժման նշանակետ նման նախաբորբոքային զարգացումները կարող են լինել մետաստազների դեմ պայքարի արդյունավետ միջոց:

Քրոնիկ բորբոքում – մետաստազավորում – S100A4:

Earlier we have shown an immense upregulation of metastasis-promoting gene S100A4 in affected tissues and plasma of patients suffering from cancer, as well as in pro-inflammatory pathways in tumor metastasis were presented. However, its role in inflammation remains unclear. Here data elucidating a putative link of S100A4 with inflammation on the model of cancer progression is presented. The involvement of S100A4 in chronic inflammatory disorders in humans was studied and the molecular mechanisms implicating S100A4 in the pathogenesis of inflammation-associated, particularly in cancer progression (metastasis) were disclosed. In conclusion these findings suggest that chronic inflammation mediated by S100A4 protein can promote metastasis. Therefore, that therapeutic targeting of such pro-inflammatory pathways should be effective in combating metastatic disease.

Chronic inflammation – Metastasis – S100A4

Воспаление – часть естественной системы защиты организма, при которой мобилизованные иммунные клетки активно борются со стрессами различного характера, к которым относятся прежде всего болезнетворные микроорганизмы, травмы и т.д., с целью восстановления нормального гомеостаза. S100A4 является геном, способствующим метастазированию, экспрессия которого была обнаружена при хроническом воспалении. Однако "персистирование" первоначально "полезного" воспалительного процесса и неугасание активности иммунных клеток приводят к разного рода хроническим воспалениям. Процесс этот является патологическим и, как сегодня стало понятно, вносит колоссальный вклад в патогенез многих серьезных хронических болезней человека, включая все стадии опухолеобразования.

Воспалительные процессы приводят к развитию многих хорошо известных заболеваний, к которым относятся более 60 аутоиммунных заболеваний (ревматоидный артрит, множественный склероз, псориаз, диабет и др.), атеросклероз и различные заболевания сердечно-сосудистой системы, нейродегенеративные заболевания (синдром Альцгеймера, болезнь Паркинсона), психические болезни (депрессии, шизофрения), злокачественные новообразования, безусловно, связанные со старением организма.

Воспаление – одно из предрасполагающих факторов опухолеобразования [1].

В последнее десятилетие особое внимание уделяется изучению воспалительных процессов, приводящих к развитию различных злокачественных опухолей. Воспаление, ассоциированное с развитием рака, можно разделить на несколько категорий:

- хроническое воспаление, инициирующее малигнизацию,
- воспаление микросреды опухоли и сайтов метастазирования (рис.1),
- воспаление, индуцированное химио- и радиотерапией при лечении больных раком.

В настоящее время получены убедительные доказательства, подтверждающие некоторую роль нарушения функции иммунной системы, приводящей к “стимулированию процессов онкогенеза”, что в какой-то степени противоречит широко принятому ранее мнению об её исключительной противоопухолевой роли. В результате подобного сбоя исход и прогрессия развития опухоли во многом будет зависеть от того, в какую сторону перемещен баланс между двумя указанными ролями иммунной системы.

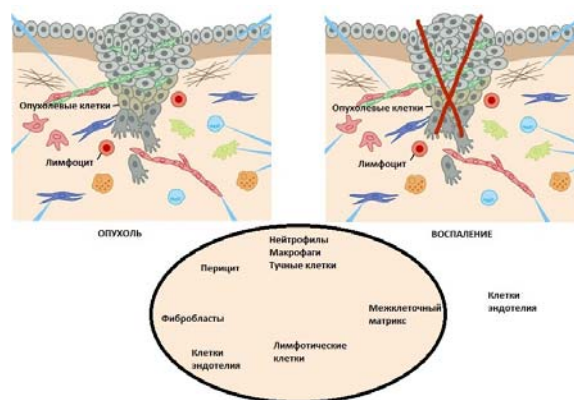


Рис.1. Воспалительный процесс в микроокружении опухоли и метастазы

Инициация процессов малигнизации в 15-25% случаев ассоциируется с локальным хроническим воспалением. На рис. 1 представлены схемы, демонстрирующие инициацию в межклеточном пространстве воспалительного процесса, способствующего образованию опухолевых и метастазирующих клеток.

Хроническое воспаление провоцирует рост и прогрессию злокачественных опухолей на всех стадиях канцерогенеза [2]. Хронические воспалительные процессы в свою очередь вызывают изменения, приводящие к развитию злокачественных новообразований. Из них следует отметить следующие заболевания:

1. Сопутствующие новообразованию различного рода хронические воспаления, главным образом ревматологические синдромы (гипертрофическая остеоартропатия, полиартрит, дерматополимиозит, васкулиты и др.), которые как бумеранг оказывают стимулирующий эффект на развитие и прогрессию опухоли.

2. Широко распространенные, асимптоматичные системные воспаления, ассоциированные с ожирением, курением, употреблением алкоголя и др.

3. Идиопатические воспаления, к которым относятся более чем 100 аутоиммунных заболеваний (например, ревматоидный артрит, воспалительные заболевания кишечника, рассеянный склероз, оба типа диабета и т.д.)

Воспалительные процессы могут развиваться вследствие химиотерапевтического и радиотерапевтического лечения больных. Инициация воспаления в процессе лечения оказывает драматическое влияние на развитие метастазов, а также на неблагоприятный исход развития ракового заболевания. Химио- и радиотерапия вызывают массивный некроз как раковых, так и здоровых клеток, который в свою очередь вызывает сильную воспалительную реакцию организма. Как один из возможных сценариев, вызванное воспаление может уменьшить терапевтический эффект, стимулируя разрастание остаточных опухолевых клеток.

Показана роль белка S100A4 в индукции процессов метастазирования (рис.2).

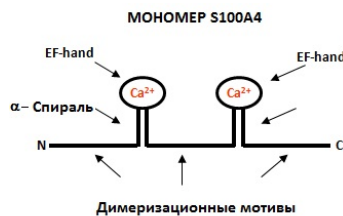


Рис.2. Структура белка S100A4 и образование димеров

Цель работы заключается в изучении участия S100A4 при хронических воспалительных заболеваниях человека и молекулярных механизмов вовлечения S100A4 в патогенез воспалительных заболеваний, в частности опухолеобразования и метастазирования.

Материал и методика.

Как показано в Датском центре по изучению рака, S100A4 – это белок, индуцируемый метастазами [3]. Авторами исследованы свойства и функция белка в культурах клеток человека и экспериментальных животных. Согласно полученным результатам исследований, сделаны следующие выводы.

В результате экспрессии белка S100A4 неметастатические клетки приобретают свойства метастатических;

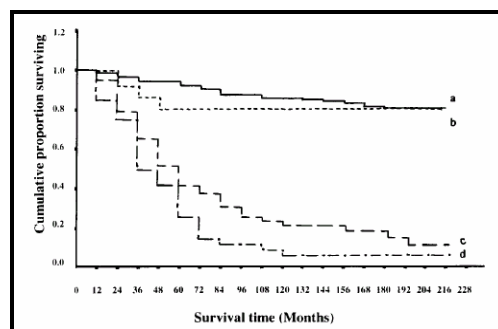
Супрессия экспрессии белка S100A4 подавляет процесс развития метастаз;

У трансгенных мышей, содержащих белок S100A4, развиваются опухоли со склонностью к метастазированию;

У трансгенных мышей, не содержащих белок S100A4, замедляется процесс опухолеобразования и не развиваются метастазы;

S100A4 предложен в качестве одного из наиболее информативных прогностических маркеров развития злокачественных опухолей.

Для определения экспрессии белка S100A4 сотрудниками Датского института биологии рака и Института неврологии и фармакологии Университета Копенгагена (Дания) был разработан и предложен метод сэндвич-иммуоферментного анализа (ИФА), с использованием очищенных рекомбинантных белков His-tagged-S100A4 и поликлональных анти-S100A4 антител [4].



a) S100A4 (-), c-erbB-2 (-) c) S100A4 (+), c-erbB-2 (-)
b) S100A4 (-), c-erbB-2 (+) d) S100A4 (+), c-erbB-2 (+)

Рис. 3. Мультивариабельный регрессионный анализ, проведенный при исследовании 137 больных, показал, что интенсивность окрашивания S100A4 значительно коррелирует с показателями смертности больных ($p < 0.0001$).

Результаты и обсуждение. Полученные данные свидетельствуют о достоверной ассоциации экспрессии S100A4 (mts1) с усилением процессов метастазирования. При получении этих результатов белок был выделен из клеточных линий аденокарциномы мышей с высокой активностью образования метастаз. При повышенной экспрессии S100A4(mts1) неметастатические клеточные линии приобретают свойства метастазирования. Подобные исследования были проведены ранее при изучении экспрессии S100A4 (mts1), коррелирующей с прогрессированием роста и стадии опухоли [6]. Кроме того, при экспрессии S100A4 (mts1) наблюдалось снижение уровня выживаемости больных раком молочной железы [5].

Можно заключить, что белок S100A4 является одним из важнейших компонентов микроокружения опухоли, что свидетельствует о том, что он относится к основным мишеням для проведения терапевтического лечения, а также ранней диагностики онкологических больных.

- Стромальные клетки, содержащие белок S100A4, аккумулируются в первичных опухолях и метастатических узлах. Кроме того, S100A4 высвобождается в микроокружение опухолей.

- S100A4 обладает способностью активировать Т-клетки, вследствие чего индуцируется провоспалительный процесс, приводящий к образованию вторичных опухолей или метастаз.
- Блокирование S100A4 в стромальных клетках опухоли может являться наиболее эффективной стратегией подавления процессов метастазирования.
- Определение S100A4 в плазме онкологических больных предлагается с целью профилактики предотвращения образования метастаз.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Balkwill F., Mantovani A.* Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*, 357, 539-545, 2001.
2. *Colotta F., Allavena P., Sica A., Garlanda C., Mantovani A.* Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*. 30, 1073-1081, 2009.
3. *Helfman D.M., Kim E.J., Lukanidin E., Grigorian M.* The metastasis associated protein S100A4: role in tumour progression and metastasis. *Br. J. Cancer*; 92, 1955–8, 2005.
4. *Novitskaya V, Grigorian M, Kriajevska M, Tarabykina S, Bronstein I, Berezin V, Bock E, Lukanidin E.* Oligomeric forms of the metastasis-related Mts1 (S100A4) protein stimulate neuronal differentiation in cultures of rat hippocampal neurons. *J Biol Chem.* 275, 52, 41278-86, 2000.
5. *Rudland P.S., Platt-Higgins A., Renshaw C. et al.* Prognostic significance of the metastasis-inducing protein S100A4 (p9Ka) in human breast cancer. *Cancer Res.* 60, 1595-1603, 2000.
6. *Takenaga K., Nakamura Y., Sakiyama S.* Expression of antisense RNA to S100A4 gene encoding an S100-related calcium-binding protein suppresses metastatic potential of high-metastatic Lewis lung carcinoma cells. *Oncogene*, 13, 331-337, 1997.

Поступила 09.01.2013



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 1(65), 2013

ԾԱՂԿԱՏՄԱՆ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԾԽԱԽՈՏԻ ՍԱՄՍՈՒՆ 36 ՍՈՐՏԻ ԿԵՆՍԱՐԴՅՈՒՆԱՎԵՏՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Ռ.Կ. ՄԻՄՈՆՅԱՆ

Խ.Աբովյանի անվան հայկական պետական մանկավարժական համալսարան
simonyan.ruzan@mail.ru

Հոդվածում քննարկվում է ծաղկատման ազդեցությունը ծխախոտի բուրավետ խմբի Սամսուն 36 սորտի բույսերի կենսարդյունավետության վրա: Ցույց է տրված, որ ծաղկատումը էական փոփոխություններ է մտցնում վեգետացիայի ընթացքում ֆոտոսինթեզի ինտենսիվության շարժընթացում, նպաստում է վեգետատիվ օրգանների աճին, տերևների չոր կշռի և նյութականության ավելացմանը: Փորձի պայմաններում ծխախոտի տերևների չորանոցային հումքի զանգվածը ավելացել է ավելի քան 40%-ով: Եզրակացություն է արվում, որ Կոտայքի շրջանի Աբովյանի հողատարածքներում ծխախոտի Սամսուն 36 սորտի ծաղկատումը արդարացված ֆիտոտեխնիկական միջոցառում է, որը կարող է ապահովել ծխախոտագործության եկամտաբերության բարձրացում:

Սամսուն 36 – ծաղկատում – կենսարդյունավետություն – ֆոտոսինթեզի ինտենսիվություն – կենսամետրիկ ցուցանիշներ – չոր քաշ – նյութականություն

В статье обсуждается влияние дефлорации на продуктивность растений табака сорта Самсун 36, принадлежащего к ароматической группе табака. Показано, что дефлорация вносит существенные изменения в динамику интенсивности фотосинтеза в процессе вегетации, способствует росту вегетативных органов и повышению сухого веса и материальности листьев. В условиях проведения опыта количество сушильного сырья листьев табака повысилось более чем на 40%. Делается вывод, что на землях Абовяна Котайкского района дефлорация табака сорта Самсун 36 является оправданным фитотехническим мероприятием, обеспечивающим рост доходности табаководства.

Самсун 36 – дефлорация – биопродуктивность – интенсивность фотосинтеза – биометрические показатели – сухой вес – материальность

The article discusses defloration's influence on the plants bioproductivity of tobacco fragrant group's sort Samsun 36. It is shown, that defloration cause essential alterations in vegetation course on dynamic of photosynthesis intensivity, promote the growth of vegetative organs and increase in dry weight and materiality of leaves. In conditions of the experience tobacco leaves dry raw material's quantity increased more than 40 %. It is concluded that on Abovyan's soils of Kotayk district tobacco Samsun 36 sort's defloration is justified phytotechnical measure, which can secure rise of profitable tobacco business.

Samsun 36 – defloration – bioproductivity – photosynthesis intensivity – biometric indexes – dry weight - materiality

Բույսերի աճը և զարգացումը կարգավորող ֆիտոտեխնիկական միջոցառումներից է ծաղկատումը: Բույսերի անհատական զարգացման ընթացքում ծաղկումը հանդիսանում է կենսական բոլոր պրոցեսների մոբիլիզացման շրջան: Ուստի ծաղկատման նպատակն է ծաղկող օրգանների նորմավորումը, ինչը նպաստում է բույսերի հաջող պտղաբերմանը և բերքի ավելացմանը: Գործնականում ծաղկատումը կատարվում է, ելնելով տնտեսապես արժեքավոր բերք ստանալու նկատառումներից:

Այդ տեսակետից ուշադրության է արժանի ծխախոտի տեխնիկական բույսը, որը պատմականորեն երկար ժամանակում մշակվում է Հայաստանում: Այդ մշակաբույսի բերքատվությունը բարձրացնող ֆիտոտեխնիկական միջոցառումների ուսումնասիրությունը և ստացված արդյունքները կարող են օգտագործվել և գործնականում ներդրվել ծխախոտագործների կողմից:

Նյութ և մեթոդ: Ուսումնասիրության օբյեկտ են հանդիսացել մորմագգիների (*Solanaceae*) ընտանիքի *Nicotiana* ցեղին պատկանող ծխախոտի (*N. tabacum* L.) Սամսուն 36 սորտի բույսերը: Սորտը պատկանում է ծխախոտի բուրավետ խմբին և ներկայումս լայնորեն շրջանացվում է Հայաստանում: Այն բուծվել է Տեխնիկական մշակաբույսերի գիտահետազոտական կայանում հետադարձ բազմակի խաչասերումների մեթոդով: Նրան բնորոշ է համեմատաբար արագ աճեցողությունն ու միջավայրի նկատմամբ ցածր պահանջկոտություն: Պատկանում է միջահաս խմբին, դիմացկուն է կեղծ ալրացողի և դաշտում տերների այրման նկատմամբ [2]:

Աշխատանքը կատարվել է Կոտայքի մարզի ՀՀ Գյուղատնտեսության նախարարության տեխնիկական մշակաբույսերի Արովանի փորձակայան ՓԲԸ հողատարածքում 2011թ. վեգետացիոն սեզոնի ընթացքում: Սաժիլները աճեցվել են արևային ջերմոցներում, դաշտ են տեղափոխվել մայիսի 31-ին 42 օրեկան հասակում: Վեգետացիայի ընթացքում բույսերը խնամվել են ըստ ընդունված ագրոկանոնների:

Գեներատիվ փուլին անցնելու շրջանում և ծաղկումը գրանցելուց հետո փորձնական բույսերը ենթարկվել են ծաղկատման (օգոստոսի 24-ին):

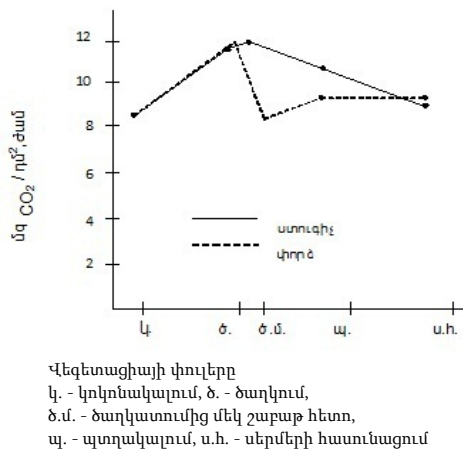
Բույսերի մորֆո-ֆիզիոլոգիական որոշումները կատարվել են 2 ժամկետում: Առաջինը՝ զանգվածային կոկոնակալման փուլում. օգոստոսի 18-ից 21-ը: Երկրորդը՝ համընկել է արտադրական նպատակով կատարված 4 քաղի հետ՝ սեպտեմբերի 17-ից 24-ը: Դիտարկումներ են կատարվել բույսերի բարձրության, ցողունի հաստության, տերևների թվի, մակերեսի, չոր քաշի և նյութականության վերաբերյալ: Ուսումնասիրվել է ֆոտոսինթեզի ինտենսիվությունը:

Չափումները կատարվել են չափիչ գործիքների օգնությամբ (քանոն, ձողակարկին): Տերևների մակերեսը որոշվել է տափօղակների մեթոդով [5]: Հաշվի առնելով տերևների միջին մակերեսը և միջին չոր կշիռը, որոշվել է նրանց նյութականությունը: Ծխախոտի տերևների ֆոտոսինթեզի ինտենսիվությունը պարզվել է Սաքսի կողմից մշակված՝ տերևների կեսերի չոր քաշի փոփոխման եղանակով [1]:

Ծաղկատման հետևանքով չորանոցային հումքի ավելացման չափը որոշելու համար 4-րդ քաղի շրջանում 10-ական բույսերի (ստուգիչ և փորձ) տերևները ենթարկվել են սովորական չորացման և կշռվել են: Ստացված արդյունքները վերածվել են 100 000 բույսի 1 հա հաշվով (ըստ կայանում ընդունված սխեմայի 1 հա հողատարածքի վրա տնկվում է մոտ 100 000 բույս):

Չափումները կատարվել են առավոտյան ժամը 9.00-ից մինչև 13.00-ն: Տվյալները մշակվել են վիճակագրորեն [1]:

Արդյունքներ և քննարկում: Ծխախոտի ծաղկատումը էական փոփոխություններ է առաջացնում վեգետացիայի ընթացքում ֆոտոսինթեզի ինտենսիվության շարժընթացում (նկ. 1):



Նկ.1. Ծաղկատման ազդեցությունը ծխախոտի Սամսուն 36 սորտի բույսերի ֆոտոսինթեզի ինտենսիվության վրա

Ինչպես երևում է, ստուգիչ և փորձնական բույսերը նախքան ծաղկատելը՝ կոկոնակալման և ծաղկման փուլերում, գործնականորեն ցուցաբերել են ֆոտոսինթեզի հավասար ինտենսիվություն: Ստուգիչ բույսերի մոտ այդ գործընթացը արտահայտվել է միազագաթ կորով, որի առավելագույնը համընկել է ծաղկման և ծաղկատումից մեկ շաբաթ անց ժամանակաշրջանի հետ: Փորձնական բույսերի մոտ ծաղկատումից մեկ շաբաթ հետո ֆոտոսինթեզի ինտենսիվությունը նկատելի նվազել է: Հավանաբար, ծաղկատումը ծխախոտի բույսերի մոտ հարուցում է ֆոտոսինթեզի ինտենսիվության փոփոխությամբ արտահայտված բնականոն կենսագործունեության շեղում: Այսպես, ըստ Շտոկկերի [6], անբարենպաստ ներգործություններին բուսական օրգանիզմի պատասխան ռեակցիան արտահայտվում է 2 փուլով. առաջինը ռեակցիայի փուլն է, երբ էական շեղումներ են նկատվում նյութափոխանակության և ֆիզիոլոգիական ֆունկցիաների ոլորտում: Երկրորդը ռեստիտուցիայի փուլն է, այսինքն խախտված պրոցեսների վերականգնման և նոր մակարդակով նրանց կայունացման փուլը: Մեր փորձերում ռեակցիայի փուլն արտահայտվել է ծաղկատումից մեկ շաբաթ հետո, իսկ հետագայում բույսերը թևակոխել են ռեստիտուցիայի փուլը, որի շնորհիվ փորձնական տարբերակում գրանցվել է ֆոտոսինթեզի ինտենսիվության որոշակի բարձրացում: Այսպես, ծաղկատումից մեկ շաբաթ անց ծաղիկներով վիճակի համեմատությամբ փորձնական բույսերի ֆոտոսինթեզի ինտենսիվությունը նվազել է 23,6%-ով, իսկ պտղաբերման փուլում՝ աճել 11,1 %-ով (նախորդ փուլի համեմատությամբ):

Նման արդյունքները, հավանաբար, պետք է բացատրել նաև այն հանգամանքով, որ ծաղիկների և պտուղների բացակայության պայմաններում սինթեզված ասիմիլյատները ուղղվում են նաև արմատային համակարգի աճին, նպաստելով նրանց կլանող և նյութափոխանակային ֆունկցիայի իրականացմանը, արմատա-տերևային կապի ուժեղացմանը [8]: Այսպես, սերմերի հասունացման փուլում փորձնական բույսերի ֆոտոսինթեզի ինտենսիվությունը նույնիսկ որոշ չափով գերազանցել է ստուգիչ բույսերի ասիմիլյացնող ունակությունը:

Ծաղկատումը զգալի ազդեցություն է թողել ծխախոտի բույսերի կենսամետրիկ ցուցանիշների վրա (աղ. 1): Ստուգիչ և փորձնական բույսերի բարձրությունը ծաղկատումից առաջ գրեթե չի տարբերվել: Մինչև 4-րդ քաղի շրջանը ըստ բարձրության աճման պրոցեսները համեմատաբար թույլ են եղել ստուգիչ (+3,2%) և ուժեղ՝ փորձնական (+4,6%) բույսերի մոտ, ինչը, ըստ երևույթին պայմանավորված է միջհանգույցների չնայած թույլ, բայց շարունակական աճով:

Աղ.1. Ծխախոտի Մամսուն 36 սորտի բույսերի կենսամետրիկ ցուցանիշները ծաղկատումից առաջ (18-21.08.2011) և հետո (17-24.09.2011) (n=20)

Կենսամետրիկ ցուցանիշներ	Ստուգիչ, M(m)			Փորձ, M(m)		
	Ծաղկատումից առաջ	Ծաղկատումից անմիջապես հետո	4-րդ քաղի ժամկետում (սեպտեմբեր)	Ծաղկատումից առաջ	Ծաղկատումից անմիջապես հետո	4-րդ քաղի ժամկետում (սեպտեմբեր)
Բույսերի միջին բարձրությունը, սմ	150,8±1,63	-	155,6±2,29	152,7±2,14	140,8±2,08	147,3±2,16
Ցողունի տրամագիծը, մմ	10,6±0,23	-	11,1±0,28	10,7±0,37	-	12,8±0,34

Ուսումնասիրվող բույսերի ցողունի միջին տրամագծի վերաբերյալ պարզվել է, որ ստուգիչ բույսերի մոտ այս ցուցանիշը ավելացել է ընդամենը 4,7%-ով, իսկ ծաղկատված բույսերի մոտ՝ 19,6%- ու: Հայտնի է [4], որ բույսերի աճման կետերը և գեներատիվ օրգանները օժտված են ձգայնության հզոր ունակությամբ, որի հետևանքով գեներատիվ փուլում թուլանում է վեգետատիվ օրգանների աճը [7]: Մեր փորձերի արդյունքները համընկնում են գրականության տվյալների հետ և վկայում, որ ստուգիչ բույսերի ցողունների կենսամետրիկ ցածր ցուցանիշները ծաղիկների, ապա պտուղների կազմակերպման հետևանք է:

Ծաղկատման դրական ազդեցությունը վեգետատիվ աճի վրա արտահայտվել է նաև տերևների կենսամետրիկ ցուցանիշների ոլորտում (աղ. 2): Վեգետացիայի ընթացքում տերևների աճի օրինաչափությունը ստուգիչ և փորձնական բույսերի մոտ ըստ շարահարկերի տարբերվել է:

Աղ.2. Ծխախոտի Սամսուն 36 սորտի բույսերի տերևների միջին քանակը և մակերեսը

Տերևների հարկը	Տերևների քանակը	1 տերևի մակերեսը, սմ ² M±m		Տերևների մակերեսը, սմ ²		Ավելացման %
		Նախքան ծաղկատումը (18-21.08.2011)	Ծաղկատումից հետո (17-24.09.2011)	Նախքան ծաղկատումը (18-21.08.2011)	Ծաղկատումից հետո (17-24.09.2011)	
Մ Տ Ո Ւ Գ Ի Զ						
Հիմք	9	162,6±6,34	189,8±5,83	1463,4	1708,2	16,7
Միջին	31	191,3±7,06	234,4±10,72	5930,3	7266,4	22,5
Վերին	7	56,3±1,39	62,4±1,48	394,1	436,8	10,8
Ամբողջը	47	-	-	7787,8	9411,8	20,8
Փ Ո Ր Զ						
Հիմք	10	191,0±6,12	235,2±7,23	1910,0	2352,0	23,1
Միջին	33	237,1±11,06	305,2±10,21	7824,7	10071,6	28,7
Վերին	6	54,7±2,86	76,1±3,27	328,2	456,6	39,1
Ամբողջը	49	-	-	10062,9	12880,2	28,0

Առաջինների մոտ առավելագույն աճով աչքի են ընկել միջին, նվազագույնով՝ վերին շարահարկի տերևները: Ծաղկատված բույսերի մոտ՝ ընդհակառակը, ստորին հարկից մինչև վերինը տերևների աճի ինտենսիվությունը ավելացել է: Դրա հետ մեկտեղ տերևների աճի տեմպերը անհամեմատ բարձր են եղել փորձնական բույսերի մոտ: Այն հանգամանքը, որ փորձի 2 տարբերակում էլ հիմքային հարկի տերևների աճի տեմպերը զիջում են միջին հարկի տերևների ցուցանիշներին, պայմանավորվում է նրանց ծերացմամբ և կենսագործունեության անկմամբ: Սակայն փորձնական բույսերի մոտ ստորին հարկի տերևները ավելի բարենպաստ պայմաններում են գտնվում ասիմիլյատներով մատակարարվելու տեսակետից (գեներատիվ օրգանների բացակայության հետևանքով), ինչի արդյունքում նրանց աճի տեմպերը ավելի բարձր են, քան ստուգիչ տարբերակի բույսերի մոտ: Մյուս հարկերում ևս պահպանվում են տերևների մակերեսի աճի բարձր տեմպերը, որոնք ստորին հարկից դեպի վերինը ավելանում են:

Ստուգիչ բույսերի վերին հարկի տերևների աճի չափազանց թույլ տեմպերը կարելի է բացատրել վերարտադրող օրգաններին առավել մոտ դիրքով, ինչի պատճառով ֆոտոասիմիլյատները ավելի արագ են մուտք գործում այդ օրգանները [3]: Ստուգիչ բույսերի տերևային ընդհանուր մակերեսը վեգետացիայի ընթացքում ավելացել է 20,8%-ով, իսկ փորձնական տարբերակի բույսերի մոտ՝ 28%-ով:

Ծաղկատման պարագայում տերևային մակերեսի աճը զուգորդվել է օրգանական զանգվածի՝ չոր նյութի զգալի ավելացմամբ (աղ. 3): Ինչպես երևում է, ըստ հարկերի ուսումնասիրության երկու ժամկետներում էլ տերևների չոր կշիռը գերազանցել է միջին հարկում, այն ժամանակ, երբ վերին հարկում զրանցվել են ամենացածր, իսկ հիմքի մասում՝ միջին մեծության ցուցանիշները: Ստուգիչ բույսերի մոտ դա բացատրվում է նրանով, որ վերին հարկի տերևները, մոտ գտնվելով գեներատիվ օրգաններին և նրանց ավելի առատորեն մատակարարելով ֆոտոսինթեզի արգասիքներով, ավելի քիչ են կուտակում օրգանական զանգված, իսկ հիմքի մասի տերևները համեմատաբար քիչ են կուտակում օրգանական նյութեր ծեր լինելու և ավելի վատ լուսավորվածության պատճառով: Ստուգիչ բույսերի մոտ հիմքի հարկի տերևների չոր քաշը ավելացել է 15,6%-ով, միջին շարահարկում՝ 24,5%-ով, իսկ վերինում՝ 15%-ով: Ընդհանուր բույսի հաշվով չոր քաշի ավելացումը կազմել է 22,4%:

Ծաղկատումը ընդհանրապես դրական ազդեցություն է ունեցել ծխախոտի տերևների չոր զանգվածի ավելացման վրա: Այսպես, ծաղկատումից հետո հիմքի հարկի տերևների չոր քաշը ավելացել է 27,4%-ով, միջին հարկում՝ 44,2%-ով, իսկ վերինում 50,9%-ով: Ամբողջ բույսի հաշվով նշված ցուցանիշի միջին ավելացումը կազմել է 41,3%:

Աղ.3. Ծխախոտի բույսերի տերևների չոր քաշը և նյութականությունը ծաղկատումից առաջ (18-21.08.2011) և հետո (17-24.09.2011)

Տերևների հարկը	Չոր քաշ, մգ		Տերևամակերես, դմ²		Նյութականություն, մգ/դմ²	
	Նախքան ծաղկատումը	Ծաղկատումից հետո	Նախքան ծաղկատումը	Ծաղկատումից հետո	Նախքան ծաղկատումը	Ծաղկատումից հետո
Ս Տ Ո Ւ Գ Ի Չ						
Հիմք	8824,3	10197,9	14,63	17,08	603	597
Միջին	36649,3	45632,9	59,30	72,66	618	628
Վերին	2321,3	2668,9	3,94	4,37	589	611
Ամբողջը	47794,9	58499,8	77,87	94,11	-	-
Փ Ո Ր Չ						
Հիմք	11670,1	14864,7	19,10	23,52	611	632
Միջին	48747,9	70302,6	78,25	100,72	623	698
Վերին	1982,3	2991,4	3,28	4,56	604	656
Ամբողջը	62400,3	88158,7	100,63	128,81	-	-

Ստացված տվյալները ստուգիչ բույսերի համեմատությամբ վերլուծելիս պարզվել է, որ վերին հարկում օրգանական նյութի կուտակումը գերազանցել է ստուգիչին 45,8%-ով, միջին հարկում՝ 54,1%-ով, իսկ վերին հարկում՝ 12,1%-ով: Ընդհանուր բույսի հաշվով այդ տարբերությունը կազմել է 50,7% հոգուտ փորձնական բույսերի: Ակնհայտ է, որ բույսերի տերևների չոր քաշի ավելացման հիմնական աղբյուրը միջին շաքահարկի տերևներն են: Ստացված արդյունքների հիման վրա փորձ է արվել հաշվարկել ծաղկատման հետևանքով չորանոցային հումքի ավելացման չափը: Փորձնական տարածքներում հաշվարկի արդյունքները ներկայանում են հետևյալ կերպ. արտադրական բերքը՝ 23 գ/հա, ծաղկատված բույսերի չորանոցային բերքը ավելացել է 9.57 գ/հա կամ 41.6 %-ով, կազմելով 32.57 գ/հա:

Ծաղկատման հետևանքով չոր քաշի փոփոխությունը անդրադարձել է ծխախոտի տերևների նյութականության վրա: Աղ. 3-ի տվյալները վկայում են, որ ծաղկատումը նպաստել է ծխախոտի հումքի այդ կարևոր տեխնոլոգիական ցուցանիշի ավելացմանը: Ստուգիչ բույսերի տերևների նյութականությունը, համեմատած մինչև ծաղկատման ժամկետի հետ, ընդհանուր բույսի հաշվով աճել է 1,5%-ով: Փորձնական բույսերի մոտ նյութականության աճը անհամեմատ բարձր է եղել՝ ամբողջ բույսի հաշվով 8%: Դրան զուգահեռ ստուգիչ բույսերի տերևների միջին նյութականության հետ համեմատած փորձնական բույսերի մոտ ծաղկատումից հետո այդ ցուցանիշը բարձր է եղել 8,1%-ով:

Նկարագրված փոփոխությունները կարելի է բացատրել նրանով, որ ծաղիկները և սերմերը հանդիսանում են այն գլխավոր կենտրոնները, որոնք կլանում են տերևների և արմատների կենսագործունեության ընթացքում սինթեզված օրգանական նյութերի հիմնական մասը, իսկ գեներատիվ օրգանների հետագման պարագայում սննդանյութերը հիմնականում ծախսվում են վեգետատիվ օրգանների աճի վրա, կուտակվում են տերևների հյուսվածքներում:

Ամփոփելով կատարած ուսումնասիրությունները, կարելի է նշել, որ ծխախոտի Սամսուն 36 սորտի ծաղկատումը դրականորեն է ազդում բույսերի աճի և կենսազանգվածի կազմակերպման վրա: Այն արդարացված միջոցառում է Կոտայքի շրջանի Աբովյանի հողատարածքներում կիրառելու համար, երաշխավորում է տերևների բարձրորակ հումքի ստացում և հետևաբար ծխախոտագործության եկամուտների բարձրացում:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. *Թանգալյան Տ.Վ.* Բույսերի ֆիզիոլոգիայի գործնական աշխատանքներ, Երևան, «Մանկավարժ» հրատարակչություն, 295 էջ, 2000:
2. *Ներսիսյան Պ.Մ.* Ծխախոտի մշակությունը Հայաստանի Հանրապետությունում, Երևան, Grand Tobacco, 12 էջ, 1999:

3. *Лютте У., Хигинботам Н.* Передвижение веществ в растениях, М., Колос, 407 с., 1984.
4. *Мокронос А.Т.* Донорно-акцепторные отношения в онтогенезе растений. В кн.: "Физиология фотосинтеза" М., Наука, с. 235-250, 1982.
5. *Ничипорович А.А., Строганова Л.Я., Чмора С.Н., Власова М.П.* Фотосинтетическая деятельность растений в посевах, М., Изд. АН СССР, 160с., 1961.
6. *Штоккер П.Г.* Физиологические и морфологические изменения в растениях, обусловленные недостатком воды. В сб.: "Растение и вода", М., Наука, с. 27-38, 1970.
7. *Milford G.E., Pearman S.* The relationship between photosynthesis and concentration of carbohydrate in leaves of sugar beet. *Photosynthetica*, 9, 1, p. 78-83, 1979.
8. *Shiroya M., Lister G., Slankis V., Krotkov G., Nelson C.* Translocation of the products of photosynthesis to roots of pine seed lings. *Can.J.Bot.*, 51, p. 1125-1135, 1973.

Ստացվել է 09.07.2012



Биолог. журн. Армении, 1 (65), 2013

ОБНАРУЖЕНИЕ *RHABDOCHONA MACROSTOMA* (*NEMATODA: RHABDOCHONIDAE*) У СЕВАНСКОЙ ХРАМУЛИ

Р.Л. ОГАНЕСЯН, М.Я. РУХКЯН

Научный центр зоологии и гидроэкологии НАН РА,
Институт зоологии
ruhov37@rambler.ru

Изучена гельминтофауна храмули оз. Севан (*Capoeta capoeta sevangi* Filippi, 1865). Обследовано 76 экз. севанской храмули.

Обнаружена нематода *Rhabdochona macrostoma* Moravec & Mikailov, 1970, паразитирующая в кишечнике храмуль. Дано описание вида.

Озеро Севан – гельминтофауна храмуль – нематоды

Ուսումնասիրվել է Սևանա լճի կողակների հելմինթոֆաունան (*Capoeta capoeta sevangi* Filippi, 1865): Հետազոտվել է Սևանի կողակի 76 նմուշ:

Հայտնաբերվել է *Rhabdochona macrostoma* Moravec & Mikailov, 1970 նեմատոդը, որը մա-կաբուծում է կողակների աղիներում: Տրված է տեսակի նկարագրությունը:

Սևանա լիճ – կողակների հելմինթոֆաունա – նեմատոդներ

The research of khramulya's helminth fauna from Sevan Lake has been conducted (*Capoeta capoeta sevangi* Filippi, 1865). Seventy-six samples of khramulya have been investigated.

The nematode *Rhabdochona macrostoma* Moravec & Mikailov, 1970 was found in the intestine of the khramulya. The description of the species is given.

Lake Sevan – the helminth fauna of khramulya – nematodes

Озеро Севан – одно из высокогорных пресноводных олиготрофных озер, расположено в горно-степном ландшафте Армении на высоте 1900 м.

За последние десятилетия в оз. Севан произошли крупнейшие антропогенные преобразования: строительство водохранилищ, электростанций, интродукция рыб, их естественное и искусственное расселение, загрязнение водоема сточными водами и т.д. Нерациональное использование водных ресурсов озера привело к понижению его уровня более чем на 20 м. Оно подверглось эвтрофированию. В биоразнообразии озера произошли большие изменения. За 25 лет плотность рыбы сократилась почти в 20 раз. Это привело к исчезновению некоторых эндемичных видов рыб и резкому сокращению численности других [4]. Для спасения озера государством были приняты меры по поднятию уровня воды. Все эти явления повлияли на изменения видового состава гидробионтов. Естественно предположить, что с изменением биоразнообразия озера, происходящим в результате воздействия антропогенных факторов, изменился и видовой состав гельминтов рыб.

Целью исследований было изучение видового состава гельминтофауны севанской храмули на фоне антропогенного пресса.

Материал и методика. Материалом исследований послужили собственные сборы гельминтов от севанских храмуль. Исследования проводили в летне-осенний период 2010 - 2011 гг. на оз. Севан, у истока р. Раздан.

Методом полных гельминтологических вскрытий было обследовано 76 экз. севанской храмули – *Capoeta capoeta sevangi* Filippi, 1865 (сем. *Cyprinidae*), в возрасте 1-2 лет. Сбор и камеральную обработку нематод проводили по методике И.Е. Быховской-Павловской, 1985. Фиксацию проводили в жидкости Барбагалло. Для просветления использовали молочную кислоту.

Определение нематод проводили по “Определителю паразитов пресноводных рыб фауны СССР” [11].

Результаты и обсуждение. У севанской храмули зарегистрирован новый вид в гельминтофауне рыб Армении – нематода *Rhabdochona macrostoma* Moravec & Mikailov, 1970. Гельминт паразитирует в кишечнике храмуль. Экстенсивность инвазии составляла 9 %, интенсивность инвазии – 1 экз.

Описание вида *Rhabdochona macrostoma* Moravec & Mikailov, 1970 (рис.1).

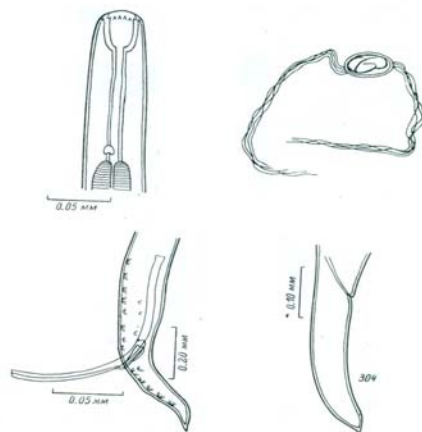


Рис.1. *Rhabdochona macrostoma* Moravec & Mikailov, 1970

а – передний конец тела, б – яйцо с филаментами,
в – хвостовой конец тела самца, г – хвостовой конец тела самки

Нитевидные нематоды средних размеров. Передние и задние концы тела сужены. Тело нематод небольшое, с гладкой кутикулой. Хвостовой конец особей обоих полов конический, с выраженным кутикулярным шипом.

Длина тела самцов составляла 5,70-6,20 мм, максимальная ширина – 0,16 мм.

Длина спикул резко отличается друг от друга. Длина большей спикулы равна 0,70 мм, меньшей – 0,10 мм. Соотношение длин спикул составляло 7:1. Хвостовой конец самца конический, длиной 0,30 мм, с кутикулярным шипом.

У самок длина тела составляла 8,10–8,30 мм, максимальная ширина – 0,30 мм. Хвостовой конец тела самки узкий, с выраженным кутикулярным отростком. Длина его – 0,25 мм. Зрелые яйца овальные, содержат личинку. На обоих полюсах яиц имеется по одному длинному филamentу (0,10 мм).

Rhabdochona macrostoma – автогенный вид, размножающийся в водной среде. Промежуточными хозяевами этой нематоды являются личинки амфибиотических насекомых, в частности, личинки поденок (*Ephemeroptera*) из рр. *Ephemerella*, *Heptagenia* и др. [15].

Необходимо отметить, что, в связи с подъемом уровня воды оз. Севан, начался процесс восстановления бентофауны – одной из составляющих кормовой базы рыб [1]. Видовое разнообразие бентоса озера претерпело положительные изменения по сравнению с 1990-ми гг. Так, если в 1991г. в составе макробентоса озера личинки поденок практически не встречались, то в 2005–2006 гг. было обнаружено 25 бентосных видов, в т.ч. и личинки поденок из рр. *Ephemerella*, *Heptagenia* и др. [1].

По характеру питания храмуля относится к детрито–фитофагам [5]. В результате исследований Габриеляна [5] по изучению питания севанской храмули, анализ спектра питания показал, что питание молоди в возрасте 1–2 лет носит смешанный характер (зоопланктон – зообентос) с преобладанием зоопланктона. По мере роста рыб роль зоопланктона в питании храмули постепенно снижается, возрастает значение зообентоса. Из бентосных организмов молодь храмули поедает больше всего личинок хирономид и поденок. Начиная с трехлетнего возраста, наблюдается переход на детритофагию [5]. Наличие в составе её пищи зооорганизмов рассматривается как случайное заглатывание их вместе с детритом или растениями.

Что касается обнаружения других видов нематод р. *Rhabdochona* в Армении, в 1931г. Динником у севанской храмули впервые зарегистрирован другой представитель рода – *Rhabdochona fortunatovi* [7]. Однако в исследованиях 60–90-х гг. прошлого столетия данный вид не был найден [2, 6, 8, 9, 12]. Впоследствии нематода *Rh. fortunatovi* была обнаружена в 2000-х гг. [3, 10, 13]. Рубенян изучала состав пищевых компонентов кишечника взрослой храмули, в котором преобладал песок, остальную часть составляли детрит, растения (нитчатые водоросли), зообентос (личинки и куколки хирономид, брюхоногие моллюски, остракоды) и зоопланктон (копеподы и кладоцеры). Автор полагает, что взрослая храмуля потребляет не только детрит и растения, но питается и животной пищей. Появление в составе фауны паразитов нематоды *Rh. fortunatovi*, по мнению автора, является отражением изменения состава пищи севанской храмули, которая в настоящее время довольно интенсивно питается личинками подёнок [13].

Из сопредельных территорий *Rhabdochona macrostoma* обнаружена в Ираке. Два вида р. *Rhabdochona* Railliet, 1916 (Nematoda: Rhabdochonidae) были зарегистрированы в карповых рыбах из бассейна р. Тигр на севере Ирака: взрослые *Rh. tigridis* Rahemo, 1978 у *Capoeta trutta* и *Cyprinion macrostomum* и личинки *Rh. (Globochona) sp. macrostomum* у усачей *Barbus barbulus* и *Barbus kersin* [14].

Изменения кормовой базы рыб, численности промежуточных хозяев паразитов и др. параметров, происходящие в оз. Севан за последние десятилетия в результате воздействия антропогенных факторов, приводят к изменениям видового состава гельминтов рыб.

ЛИТЕРАТУРА

1. Акопян С.А., Джендереджян К. Г. Зообентос озера Севан. В кн.: Экология озера Севан в период повышения его уровня. Результаты исследований Российско-Армянской биологической экспедиции по гидроэкологическому обследованию озера Севан (Армения) (2005–2009 гг.). с. 206–214, 2010.

2. *Вартанян Л.К.* Паразитофауна рыб озера Севан и некоторых других водоемов и водотоков Армении. Автореф. канд. дисс., Ереван, 22 с., 1993.
3. *Воропаева Е.Л., Толстенков О.О., Оганесян Р.Л.* Современное состояние паразитофауны рыб озера Севан. В кн.: Экология озера Севан в период повышения его уровня. Результаты исследований Российско-Армянской биологической экспедиции по гидроэкологическому обследованию озера Севан (Армения) (2005-2009 гг.), изд-во Махачкала: Наука, ДНЦ, с. 290-306, 2010.
4. *Габриелян Б.К.* Ихтиофауна озера Севан в различные периоды понижения его уровня. Автореф. докт. дисс., Ереван, 33 с., 2006.
5. *Габриелян Б.К. и др.* Питание храмули – *Varicorhinus capoeta sevangi* (Filippi) в изменившихся условиях озера Севан. Биолог. журн. Армении, **40**, 10, 856-859, 1987.
6. *Григорян Дж. А.* Изменение паразитофауны рыб озера Севан в разные годы (до и после спуска озера). Биолог. журн. Армении, **33**, 3, с. 300-306, 1980.
7. *Динник Ю.А.* Паразитические черви рыб оз. Севан. Тр. Севанской озерной станции, Ереван, **4**, 1-2, с. 105-132, 1932.
8. *Минасян А.К., Бегоян Ж.Г.* К изучению гельминтофауны храмули оз. Севан. Биолог. журн. Армении, **24**, 12, с. 73-79, 1971.
9. *Оганесян Р.Л.* О гельминтофауне карповых рыб оз. Севан. Тез. докл. респ. научн. конф. по зоологии, Ереван, с. 87-88, 1998.
10. *Оганесян Р.Л.* Новые виды в гельминтофауне рыб Армении. Биолог. журн. Армении, **61**, 3, с. 32-37, 2009.
11. Определитель паразитов пресноводных рыб фауны СССР, **3**, 583 с., 1987.
12. *Платонова Т.А.* Паразитофауна севанских рыб. Паразитологический сборник, **21**, с. 65-68, 1963.
13. *Рубенян Т.Г.* Гельминты севанской храмули как индикаторы питания. Мат. Межд. науч. конф. М., 2008.
14. *Moravec F. et al.* Two species of Rhabdochona Railliet, 1916 (Nematoda: Rhabdochonidae) parasitising cyprinid fishes in Iraq, with a redescription of *R. tigridis* Rahemo, 1978 (emend.). Systematic Parasitology, **74**, 2, 125-135, 2009.
15. *Moravec F.* Studies on the development of the nematodes Rhabdochona (Filochona). Folia parasitol., **19**, p. 231-333, 1972.

Поступила 06.03.2013



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 1(65), 2013

ՆՈՐ ՏՎՑԱԼՆԵՐ ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԼՎԻՃՆԵՐԻ ՄԱԿԱԲՈՒՑԾ ԱՖԻԴԻԴՆԵՐԻ (HYMENOPTERA, APHIDIIDAE) ՎԵՐԱԲԵՐՅԱԼ

Գ.Ա.ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ¹, Ե.Կ.ՀԵՐԹԵՎՅԱՆ², Ռ.Գ.ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ²

¹ ՀՀ ԳԱԱ Բուսաբանության ինստիտուտ

² ՀՀ ԳԱԱ Կենդանաբանության և հիդրոէկոլոգիայի ԳԿ
harruz@yandex.ru

Հոդվածում ներկայացված են նոր տվյալներ Հայաստանի ֆաունայի աֆիդիդների՝ լվիճային հեծյալների վերաբերյալ: 29 տեսակի տեր-լվիճներից ստացվել են դրանց վրա մակաբուծող 28 տեսակի աֆիդիդներ: 14 տեսակի մակաբուծներ առաջին անգամ են նշվում Հայաստանի ֆաունայի համար:

Լվիճներ – մակաբուծներ – լվիճային հեծյալներ – աֆիդիդներ

В статье приводятся новые данные об афидидах – тлевых наездниках фауны Армении. Из 29 видов тлей-хозяев выведены 28 видов афидиид, паразитирующих на них. 14 видов афидиид отмечаются впервые для фауны Армении.

Тли – паразиты – тлевые наездники – афидииды

New data out of aphidiids – aphid-riders fauna of Armenia are presented in the article. From 29 species of host-aphids 28 species of aphidiids are taken out, which are parasitizing them. 14 species aphidiids marked for the first time for the fauna of Armenia.

Aphids – parasites – aphid riders – aphidiids

Գյուղատնտեսական մշակաբույսերի և զեղազարդ տնկարկների վնասատու լվիճների դեմ մղվող պայքարի միջոցառումների մշակման նպատակով վերջին տարիներին լայնածավալ աշխատանքներ են տարվում դրանց բնական թշնամիների հայտնաբերման և օգտագործման ուղղությամբ:

Հայաստանում լվիճների էնտոմոֆագ-մակաբուծների ուսումնասիրությունները սկսվել են դեռևս 20-րդ դարի 70-ական թվականներից: Մասնավորապես, հետազոտվել են հեծյալների *Aphelinidae* Thomson, 1876; *Encyrtidae* Walker, 1832; *Pteromalidae* Dalman, 1820 ընտանիքների մակաբուծները [1, 2]: Լվիճների քանակի արդյունավետ կարգավորման գործում զգալի դեր ունեն նաև *Aphidiidae* Haliday, 1833՝ լվիճային հեծյալների, մասնագիտացված ընտանիքի ներկայացուցիչները:

Ներկայումս համաշխարհային ֆաունայում հայտնի են այս ընտանիքի 51 սեռի 600 տեսակներ [3, 4, 5]: Հայաստանի ֆաունայի *Aphidiidae* ընտանիքին նվիրված աշխատանքներում ներկայացված են տեղեկություններ 23 տեսակի աֆիդիդների մասին, որոնք ստացվել են 33 տեսակ լվիճներից [2, 6]:

Նյութ և մեթոդ: Հավաքները կատարվել են Երևանի բուսաբանական այգում և Հայաստանի 6 (Լոռու, Կոտայքի, Արմավիրի, Արարատի, Կյոյոց Ձորի, Սյունիքի) մարզերում: Մակաբուծների ստացման համար լվիճները դաստիարակվել են համընդհանուր ընդունված մեթոդիկայով [3, 5], որն ուղեկցվել է տեր և մակաբույծ միջատների կենսաբանության և էկոլոգիայի ուսումնասիրմամբ:

Արդյունքներ և քննարկում: Ուսումնասիրությունների արդյունքում 26 տեսակ բույսերի վրա հայտնաբերվել են 29 տեսակ լվիճներ, որոնց վրա մակաբուծում են 28 տեսակ աֆիդիդներ: Հայտնաբերված լվիճային հեծյալներից 14-ը առաջին անգամ են նշվում Հայաստանի ֆաունայի համար (աղ. 1):

Աղ. 1. Լվիճների և աֆիդիդների կերային (տրոֆիկական) կապերը

№	Աֆիդիդներ	Լվիճներ	Կերաբույսեր
1.	<i>Aphidius colemani</i> Viereck.*	<i>Hyalopterus pruni</i> Geoffr. <i>Aphis fabae</i> Scop. <i>A.craccivora</i> Koch.	– – –
2.	<i>Aphidius ervi</i> Hal.*	<i>Microlophium carnosum</i> Buckton	<i>Urtica dioica</i> L.
3.	<i>Aphidius funebris</i> Mack.*	<i>Uroleucon picridis</i> F. <i>U.cichorii</i> Koch. <i>U.sonchi</i> Geoffr.	– – –
4.	<i>Aphidius hortensis</i> Marsh.*	<i>Liosomaphis berberidis</i> Kalt.	<i>Berberis vulgaris</i> L. <i>Mahonia aquifolium</i> L.
5.	<i>Aphidius matricariae</i> Hal.*	<i>Capitophorus hippophaes</i> Wlk. <i>Chaetopsiphon tetrahodus</i> Wlk.	<i>Eleagnus angustifolia</i> L. <i>Rosa canina</i> L.
6.	<i>Aphidius rosae</i> Hal.*	<i>Macrosiphum rosae</i> Hal. <i>Macrosiphoniella</i> sp. <i>Aphis euphorbiae</i> Kalt.	<i>Rosa canina</i> L. <i>Artemisia fragrans</i> Willd. <i>Euphorbia helioscopia</i> L.
7.	<i>Aphidius salicis</i> Hal.*	<i>Cavariella aegopodii</i> Scop. <i>Aphis</i> sp. <i>Semiaphis dauci</i> F.	<i>Cydonia oblonga</i> Mill. – –
8.	<i>Aphidius urticae</i> Hal.*	–	–
9.	<i>Aphidius</i> sp.aff. <i>picipes</i> Nees	–	–
10.	<i>Aphidius</i> sp.	<i>Brachycaudus divaricatae</i> Shap.	<i>Prunus divaricata</i> Led.
11.	<i>Aphidius</i> sp.	<i>Periphyllus obscurus</i> Mam.	–
12.	<i>Aphidius</i> sp.	<i>Capitophorus elaeagni</i> Del Guercio	–
13.	<i>Aphidius</i> sp.	<i>Macosiphum rosae</i> L.	–
14.	<i>Aphidius</i> sp.	<i>Dactynotus</i> sp.	–
15.	<i>Lysiphlebus confusus</i> Trambly*	<i>Brachycaudus prunicola</i> Kalt. <i>B.prunicola</i> <i>tragopogonis</i> Kalt. <i>Aphis craccivora</i> Koch. <i>Tetraneura</i> sp. <i>Aphis</i> sp.	<i>Prunus divaricata</i> Led. <i>Tragopogon dubitus</i> Scop. <i>Amaranthus retroflexus</i> L. <i>Cydonia oblonga</i> Mill. <i>Urtica dioica</i> L. <i>Ulmus glabra</i> Huds.
16.	<i>Lysiphlebus faburum</i> Marsh.	<i>Brachycaudus divaricatae</i> Shap. <i>B.prunicola</i> Kalt. <i>Aphis</i> sp. <i>Aphis</i> .sp. <i>Aphis rumicis</i> L. <i>Aphis grossulariae</i> Kalt. <i>Aphis fabae</i> L. <i>Aphis nasturtii</i> Kalt.	<i>Prunus divaricata</i> Led. <i>Prunus spinosa</i> L. <i>Urtica dioica</i> L. <i>Malus domestica</i> Borkh. <i>Rumex acetosella</i> L. <i>Ribes nigrum</i> L. <i>Arctium lappa</i> L. <i>Rhamnus cathartica</i> L.
17.	<i>Lysiphlebus</i> sp. aff. <i>crocinus</i> Mack.	<i>Chaitophorus niger</i> Mordv.	–
18.	<i>Adialitus salicapis</i> Fitch.*	<i>Chaitophorus niger</i> Mordv.	<i>Salix babylonica</i> L. <i>Populus alba</i> L.
19.	<i>Lysaphidus erysimi</i> Stry.	<i>Lipahis erysimi</i> Kalt.	<i>Eleagnus angustifolia</i> L. <i>Erysimum cupsidatum</i> M.Bieb.) Dc.
20.	<i>Monoctonus</i> sp.	<i>Chaitophorus niger</i> Mordv.	<i>Salix fragilis</i> L.
21.	<i>Lipolexis gracilis</i> Forster	<i>Aphis nasturtii</i> Kalt. <i>Aphis</i> sp. <i>Brachycaudus cardui</i> L. <i>Chaitophorus</i> sp.	<i>Rhamnus cathartica</i> L. <i>Urtica dioica</i> L. <i>Eleagnus angustifolia</i> L. <i>Salix fragilis</i> L.
22.	<i>Diaeretiellus heinzei</i> Mack.	<i>Cavariella theobaldi</i> Gill.	–
23.	<i>Diaeretiella rapae</i> M'Intosh*	<i>Aphis</i> sp.	<i>Rosa canina</i> L.
24.	<i>Trioxys aculephae</i> Marsh.*	<i>Aphis</i> sp. <i>Brachycaudus spiraea</i> Bomer	– <i>Spiraea crenata</i> L.
25.	<i>Trioxys palladus</i> Hal.*	<i>Chromaphis juglandicola</i> Kalt. <i>Aphis nasturtii</i> Kalt. <i>Myzus cerasi</i> F.	<i>Juglans regia</i> L. <i>Rhamnus cathartica</i> L. <i>Cerasus avium</i> L.
26.	<i>Trioxys</i> sp.aff. <i>thelaxis</i> Stry*	<i>Chromaphis juglandicola</i> Kalt. <i>Chaitophorus niger</i> Mordv. <i>Aphis craccivora</i> Koch. <i>Aphis</i> sp.	<i>Juglans regia</i> L. <i>Salix fragilis</i> L. <i>Goebelia pachycampa</i> A.Mc. <i>Urtica dioica</i> L.
27.	<i>Trioxys</i> sp.aff. <i>rietscheli</i> Mack.	<i>Brevicoryne brassicae</i> L.	–
28.	<i>Trioxys</i> sp.	<i>Aphis</i> .sp	<i>Urtica dioica</i> L. <i>Salix babylonica</i> L.

* - Հայաստանի ֆաունայի համար առաջին անգամ նշվող տեսակներ

Ամենաշատ հեծյալներ մակարածում են *Aphis* սեռի լվիճների վրա (11 տեսակ), 5-ական տեսակներ ստացվել են *Brachycaudus*և *Chromaphis* սեռերից:

Այսպիսով, Հայաստանի ֆաունայի համար այժմ հայտնի են 51 տեսակի աֆիդիդներ:

Տվյալ հոդվածի համար հիմք են հանդիսացել հեղինակների 1985-2005 թթ. Կատարած հավաքները, ինչպես նաև ՀՀ ԳԱԱ Կենդանաբանության և հիդրոէկոլոգիայի ԳԿ-ի միջատաբանական հավաքածուները: Նյութի որոշման գործում մեծ աջակցություն են ցուցաբերել Ա.Ա. Ջիլբարիձեն (լվիճներ) և Վ.Ի. Տոբիասը (աֆիդիդներ), որոնց խորին երախտագիտություն են հայտնում հեղինակները: Հոդվածը հարգանքի տուրք է Ե.Հերթևցյանի պայծառ հիշատակին:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. *Аветян А.С., Тряпицын В.А., Эртевян Е.К.* Обзор фауны паразитических хальцид (Hymenoptera, Chalcidoidea) Армении. Зоол.сб., 17, 33-86, 1976.
2. *Арутюнян Г.А.* Паразиты вредителей декоративных насаждений Армянской ССР. Биолог.журн. Армении, 23, 9, 85-92, 1970.
3. *Ахвледиани М.П.* Фауна и экология паразитов тлей (Hymenoptera: Aphidiidae, Aphelinidae) Восточной Грузии, Тбилиси, 103 с., 1981.
4. *Давидьян Е.М.* Афиидиды (Hymenoptera, Aphidiidae) России и сопредельных территорий. Автореф., к.б.н., С-Пб, 29, 2009.
5. *Тобиас Б.И., Кирияк И.Г.* Определитель насекомых Европейской части СССР, 3, 5, 283-308, Л., 1986.
6. *Эртевян Е.К., Аветян А.С.* Афиидиды (Hymenoptera, Ichneumonoidea, Aphidiidae) – паразиты тлей фауны Армении. Биолог.журн. Армении, 52, 3-4, 251-253, 1999.

Ստացվել է 07.11.2012



Biolog. Journal of Armenia, 1 (65), 2013

ABERRANT IMMUNE COMPLEXES AND CYTOKINE PRODUCTION IN SCHIZOPHRENIA

A.S. CHAVUSHYAN, M.R. HOVSEPYAN, A.S. BOYAJYAN

*Institute of Molecular Biology NAS RA
a_chavushyan@mb.sci.am*

In the study the influence of cryoglobulins isolated from the blood of patients with schizophrenia on the production of a number of cytokines by mononuclear cells was shown.

Cryoglobulins – cytokines – mononuclear cells – schizophrenia

Աշխատանքում ցույց է տրված շիզոֆրենիայով հիվանդների արյունից անջատած կրիոգլոբուլինների ազդեցությունը մոնոնուկլեար բջիջների կողմից մի շարք ցիտոկինների արտադրության վրա:

Կրիոգլոբուլիններ – ցիտոկիններ – մոնոնուկլեար բջիջներ – շիզոֆրենիա

В работе показано влияние криоглобулинов, выделенных из крови больных шизофренией на продукцию ряда цитокинов мононуклеарными клетками.

Криоглобулины – цитокины – мононуклеарные клетки – шизофрения

A considerable evidence suggests a role for upregulated immune response in the pathogenesis of schizophrenia (SCZ), since alterations in both the innate and adaptive immunity including autoimmune and inflammatory components were described in this pathology at both central and peripheral levels [1]. The results of our previous study revealed the detectable blood levels of type III cryoglobulins (Cgs) in SCZ and found the presence of complement activation split products in these complexes [2]. Therefore, we propose that in SCZ Cgs may be implicated in disease-associated inflammatory reactions. The aim of this study was to investigate the potential ability of Cgs isolated from the blood of SCZ patients stimulate production of a number of cytokines, namely interleukin(IL)-1 β , IL-6, IL-10, IL-8, tumor necrosis factor- α (TNF- α) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), by PBMCs. The choice of these mediators and modulators of the immune response was based upon the earlier reported data including also our own results indicating their altered levels in the blood of SCZ-affected subjects [1].

Materials and methods. Fifty five patients with chronic paranoid SCZ (ICD-10 code: F20.0) treated with typical neuroleptics (males/females: 34/21, mean age $\pm$ SD: 45.8 $\pm$ 8.4 years, mean age at the first-onset of illness $\pm$ SD: 17.4 $\pm$ 8.2 years, mean duration of illness $\pm$ SD: 28.4 $\pm$ 7.6 years) and 12 physically and mentally healthy subjects without family, past or present history of SCZ or other psychiatric disorders (males/females: 6/6, mean age $\pm$ SD: 23.2 $\pm$ 1.2 years) were involved in this study. Cgs were purified from the blood of affected subjects according to earlier described procedure [2] and kept at -30°C until further use. Concentration of Cgs was determined by measuring total protein according to the method of Lowry et al. [3] using bovine serum albumin as a standard. PBMCs were obtained from heparinized blood of healthy subjects

using standard Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia Biotech) density gradient centrifugation. Thereafter PBMCs were diluted to 3×10^5 cells/ml by Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 medium (Life Technologies, UK) supplemented with 1% glutamine, 1% penicillin-streptomycin, 1% HEPES and 1% fetal bovine serum and incubated in the humidified incubator at 37°C with 5% CO_2 . IL-10, IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , and MCP-1 levels in culture medium were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using commercially available kits (Gen-Probe Diacclone, France) according to manufacturer's instructions. Concentration of cytokines was expressed as pg/ml. Data analysis was performed by "GraphPad Prism-3.0" software (GraphPad Software Inc, USA). Ordinal descriptive statistics, Student's two-tailed t-test were used for data analysis. Values of $p < 0.05$ were considered as significant. The data for each given parameter was obtained in 10 independent experiments (with 3 repeated measurements in each) and is expressed as mean $\pm$ standard deviation (mean $\pm$ SD).

Results and Discussion. To determine whether Cgs from SCZ patients induce IL-10, IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , and MCP-1 production by PBMCs, the later were incubated with various concentrations of Cgs (range: 0.2-1.0 mg/ml) for 24 hours. After incubation the levels of cytokines were measured in culture medium. In order to assess the potential influence of gender difference on measured parameters, we compared the effects of Cgs from male patients with those from female patients on PBMCs from male and female healthy subjects, respectively. We detected that Cgs (starting from concentration 0.2 mg/ml) induced production of pro-inflammatory and chemotactic cytokines by PBMCs. Thus, after incubation of PBMCs with Cgs in concentration of 1 mg/ml the mean levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-8, and MCP-1 in the culture medium were 2.1, 12, 2.4, 5.5 and 3.7 times significantly higher ($p < 0.05$) than basal levels of corresponding cytokines estimated before the incubation. While this effects were much more pronounced when Cgs and PBMCs from female subjects were used, the detected differences were statistically insignificant ($p > 0.05$) indicating that the gender difference does not affect the production of these cytokines by PBMCs induced by Cgs. In case of IL-10 no influence of Cgs on production of this anti-inflammatory cytokine by PBMCs was observed.

The results obtained in the present study suggest that in vitro Type III Cgs isolated from the blood of SCZ patients may induce the expression of pro-inflammatory and chemotactic cytokines IL-1 β , IL-6, TNF- α and IL-8, MCP-1, respectively, by PBMCs. No influence of Cgs on anti-inflammatory cytokine IL-10 production was by PBMCs was observed. As it was already mentioned in the introduction earlier studies demonstrated increased levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-8, MCP-1 in the blood of SCZ-affected subjects [1] providing evidence on the involvement of systemic inflammatory reactions in pathogenesis of SCZ. In addition, it was shown that monocytes of SCZ patients stimulated by lipopolisaccharide released significantly higher amounts of IL-1 β and TNF- α than those of healthy subjects and that leukocyte mRNA levels of TNF- α significantly higher in first-episode SCZ patients [4]. Based upon the results obtained in the present study we concluded that Cgs may contribute to increased blood levels of these cytokines in SCZ and are involved in disease-associated activated peripheral inflammatory responses. Our suggestion does not exclude the possibility that early reported genetic or other environmental factors may be also responsible for altered blood levels of pro-inflammatory and cytotoxic cytokines in SCZ. Regarding IL-10, the increased blood levels of this cytokine earlier reported in patients with SCZ may be caused by early reported genetic factors rather than by environmental [1]. Similar effects related to TNF- α and IL-10 were observed earlier upon studying the influence of type I Cgs on PBMCs. After suppression of the complement activation the reverse effect was detected, e.g., decrease in TNF- α production and increase in IL-10 production by PBMCs in the presence of type I Cgs [5]. While IL-10 is known as inhibitor of TNF- α expression, it seems that in SCZ this regulatory mechanism does not work, since the increased levels of both cytokines were detected in this pathology [1] detected in this pathology [1].

Cgs can induce production of pro-inflammatory cytokines by PBMCs via Fc receptors as it was demonstrated in case of circulating immune complexes for TNF- α [6]. In addition, our previous study revealed the presence of the C1q complement protein, and C3-derived opsonins, natural ligands of CR1 complement receptor, in Cgs isolated from the blood of SCZ patients [2]. Binding of C3b-containing Cgs to CR1 on monocytes will induce IL-1 β release, and binding of C1q-containing Cgs to CR1 on PBMCs will induce the activation of the complement as it usually occurs in case of circulating immune complexes. Since activation of the complement stimulates the expression of chemotactic cytokines [7], we propose that the effects of Cgs towards IL-8 and MCP-1 production by PBMCs may be realized by a complement dependent mechanism. Hyperactivation of the complement cascade in SCZ was demonstrated in a number of studies [8], thus this complement-dependent mechanisms may be implicated in Cgs-induced effects both in vivo and in vitro. However, direct induction of chemokine expression by Cgs via C1qR receptors, as it was described for IL-8 in case of C1q-containing circulating immune complexes [9], cannot be excluded. Further investigations will help to clear these issues.

In summary, we concluded that Cgs presented in the blood of SCZ patients are implicated in disease-associated alterations in the immune response through induction of the expression of pro-inflammatory and chemotactic cytokines by PBMCs.

REFERENCES

1. Boyajyan A, Zakharyan R, Khoyetsyan A. Molecular and genetic indicators of aberrant immunity and apoptosis in schizophrenia. In: Sumiyoshi T, editor. Schizophrenia Research: Recent Advances. USA: Nova Science Publishers Inc.; p. 183-240, 2012.
2. Boyajyan A, Khoyetsyan A, Tsakanova G, Sim R.B. Cryoglobulins as indicators of upregulated immune response in schizophrenia. *Clinical biochemistry*. 41, 355-60, 2008.
3. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*. 193, 265-75, 1951.
4. Di Nicola M, Cattaneo A, Hepgul N, Di Forti M, Aitchison KJ, Janiri L, et al. Serum and gene expression profile of cytokines in first-episode psychosis. *Brain, behavior, and immunity*. 2012.
5. Mathsson L, Tejde A, Carlson K, Hoglund M, Nilsson B, Nilsson-Ekdahl K, et al. Cryoglobulin-induced cytokine production via Fc γ RIIa: inverse effects of complement blockade on the production of TNF- α and IL-10. Implications for the growth of malignant B-cell clones. *British journal of haematology*. 129, 830-8, 2005.
6. Mathsson L, Lampa J, Mullazehi M, Ronnelid J. Immune complexes from rheumatoid arthritis synovial fluid induce Fc γ RIIa dependent and rheumatoid factor correlated production of tumour necrosis factor- α by peripheral blood mononuclear cells. *Arthritis research & therapy*. 8:R64, 2006.
7. Selvan R.S., Kapadia H.B., Platt J.L. Complement-induced expression of chemokine genes in endothelium: regulation by IL-1-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol*. 161, 4388-95, 1998.
8. Mayilyan K.R., Weinberger D.R., Sim R.B. The complement system in schizophrenia. *Drug news & perspectives*. 21, 200-10, 2008.
9. Khalkhali-Ellis Z, Bulla G.A., Schlesinger L.S., Kirschmann D.A., Moore T.L., Hendrix M.J. C1q-containing immune complexes purified from sera of juvenile rheumatoid arthritis patients mediate IL-8 production by human synoviocytes: role of C1q receptors. *J Immunol*. 163, 4612-20, 1999.

Received 12.12.2012



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 1(65), 2013

ԽՈՐԸ ՇՆՀԱՌՈՒԹՅԱՆ ԿԱՄԱՅԻՆ ՎԵՐԱՅՄԱՆ ԲՈՒՏԵՅԿՈՅԻ ՄԵԹՈՂԻ ԿԻՐԱՌՈՒՄԸ ԲՐՈՆԽԻԱԼ ԱՍԹՄԱ ԵՎ ԹՈՔԵՐԻ ԽՐՈՆԻԿԱԿԱՆ ՕԲՍՏՐՈՒԿՏԻՎ ՀԻՎԱՆԴՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ ՈՒՆԵՑՈՂ ԱՆՁԱՆՑ ՎԵՐԱԿԱՆԳՆՈՂԱԿԱՆ ԲՈՒԺՄԱՆ ՓՈԽԼՈՒՄ

Ա.Կ. ԵՂՈՅԱՆ, Ե.Կ. ԽԱՉԱՏՐՅԱՆ, Հ.Հ. ՄԱԹԵՎՈՍՅԱՆ, Է.Ա.ՂԱԶԱՐՅԱՆ

,ԱՐԹՄԵՔԻ բժշկական վերականգնողական կենտրոն, «ՄԵԴԵԼԸ» բժշկական կենտրոն ella.ghazaryan@gmail.com

Ուսումնասիրվել են խորը շնչառության կամային վերացման (ԽՇԿՎ) մեթոդով զբաղվող 85՝ բրոնխիալ ասթմայով (ԲԱ), թոքերի խրոնիկ օբստրուկտիվ հիվանդություններով, (ԹԽՕՀ) անձանց ցուցանիշները և դրանք համեմատելով ստանդարտ բուժում ստացող հիվանդների տվյալների հետ: Մեկ տարվա հսկողության ընթացքում պարզվել է, որ ԽՇԿՎ մեթոդի կիրառումը տալիս է դրական արդյունքներ և կարելի է այն ներառել նշված ախտորոշումներով հիվանդների վերականգնողական բուժման կոմպլեքսում:

Հիպերվենտիլացիոն համախտանիշ – բրոնխիալ ասթմա – պիկֆլոումետրիա

Изучались показатели 85 больных с бронхиальной астмой и хронической обструктивной болезнью легких, применяющих метод волевой ликвидации глубокого дыхания Бутейко, в сравнении с показателями больных, получающих стандартное лечение. При наблюдении в течение года выяснялось, что применение метода имеет преимущества и рекомендуется включить его в комплекс реабилитационного лечения данных заболеваний.

Гипервентиляционный синдром – бронхиальная астма – пикфлоуметрия

The indices of 85 patients with bronchial asthma (BA), chronic obstructive pulmonary diseases (COPD) who underwent treatment with deep respiration voluntary elimination method were studied. The results with those of similar groups who had received standard treatment were compared. Our one-year study has shown that the implementation of DRVE method gives positive results and it can be included in the complex rehabilitation treatment of patients with the above mentioned pathologies.

Hyperventilation syndrome – bronchial asthma – peakflowmetria

Վերջին տարիներին նկատվող բրոնխիալ ասթմայով [4, 15] և թոքերի խրոնիկական օբստրուկտիվ հիվանդություններով [5, 12] հիվանդացության աճը թելադրել է տարբեր բուժական միջոցների ստեղծման անհրաժեշտությունը՝ մասնավորապես զանազան ինհալյացիոն գլյուկոկորտիկոստերոիդային դեղամիջոցների, որոնք լայնորեն կիրառվում են նշված հիվանդությունների բուժման սխեմաներում և զգալիորեն փոխում են հիվանդների վիճակը և կյանքի որակը: Սակայն միշտ չէ որ դեղամիջոցների օգտագործմամբ [1] հնարավոր է լինում ամբողջությամբ դեկավարել հիվանդության ընթացքը, կանխել սրացումները և բարդությունները [9]: Բարդ է և վերջնականապես բացահայտված չէ հիպերվենտիլացիոն համախտանիշի և բրոնխիալ ասթմայի փոխհարաբերությունը: Հիպերվենտիլացիոն սինդրոմի ուսումնասիրությունը սկսվել է տասնիններորդ դարի վերջին, այն համարվել է նաև ֆիզիկական ծանրաբեռնվածությունից առաջացող շնչառության խանգարում, հետագայում այլ հեղինակներ առաջ են քաշել նաև հոգեհուզական կոնցեպցիան:

Աշխատանքի նպատակն է ինհալացիոն ԳԿՄ-ի և բրոնխալայնիչ դեղամիջոցների նկատմամբ անտանելիություն՝ (սրտի ռիթմի խանգարումներ, բերանի խոռոչի և վերին շնչուղիների միկրոբային կամ սնկային ախտահարումները), ինչպես նաև դեղորայքի ձեռք բերման դժվարություններ ունեցող անձանց շարունակական բուժման համար փնտրել մեթոդներ [15], որոնց կիրառմամբ հնարավոր կլինի փոխել կյանքի որակը, կանխել հիվանդության արագումները և բարդությունները [10]:

Նյութ և մեթոդ: Քանի որ հիպերվենտիլացիոն սինդրոմի և ԲՄ-ի փոխհարաբերությունը բազմիցս քննարկվել է տարբեր հեղինակների կողմից [4], իսկ Հայաստանում Հասմիկ Հակոբյանի ղեկավարությամբ՝ 1998 թվականից հաջողությամբ կիրառվել է ԲԱ, ԹԽՕՀ, ալերգիկ ռինիտների բուժման գործում, ուստի, օգտագործելով տասը տարվա ընթացքում կուտակված տվյալների ուսումնասիրությունները շարունակվել են: ԽՇԿՎ մեթոդով զբաղվող 610 հիվանդների 82%-ի մոտ լավացում է նկատվում: Մեր կողմից առանձնացվել են ԲԱ-ով 85 ԽՇԿՎ մեթոդը կիրառողներ, որոնցից 47-ը նաև դեղորայքային հսկողության տակ են գտնվել, իսկ 38-ը միայն ԽՇԿՎ մեթոդի:

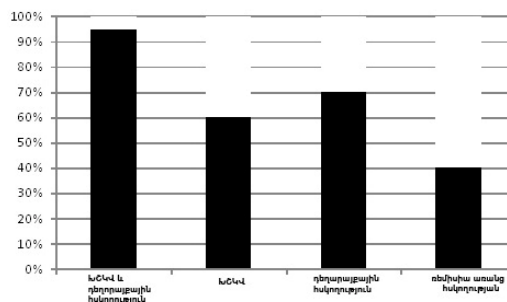
Առաջին խումբը. (47 հոգի) չափահասներ են, կանայք և տղամարդիկ՝ բոլորը ընդունում են ինհալացիոն կորտիկոստերոիդային դեղամիջոցներ՝ զուգակցված երկարատև ազդեցության (-2 ազոնիստների հետ /սերետալդ/, 6-ը՝ նաև ընդունում են լեյկոտրիենների ձևափոխիչներ:

Երկրորդ խումբը (38 հոգի) դարձյալ չափահասներ են, ընդգրկված են և՛ կանայք և՛ տղամարդիկ /երկու խմբերում էլ կանայք գերակշռող են/, դեղորայքային հսկողության տակ չեն, գտնվում են կայուն ախտադադարի փուլում: Այս խմբում ընդգրկվածներից 21-ը ուղղակի դեմ են մշտական դեղորայքային՝ առավելապես կորտիկոստերոիդային հսկողությանը, 17-ը ունեն դեղորայքի ձեռքբերման խնդիրներ: Հիվանդների վիճակը գնահատվել է ըստ հետազոտման տվյալների՝ արյան ընդհանուր քննություն, կրծքավանդակի ռենտգեն քննություն, ԷՍԳ, արտաքին շնչական ֆունկցիայի որոշում: Բրոնխներում օդի հոսքի խանգարման աստիճանը հիմնականում գնահատվել է անհատական պիկֆլուումետրերի միջոցով, միայն 40%-ի մոտ կատարվել է սպիրոգրաֆիա՝ Easy One (TM) diagnostic սպիրոմետրով:

Երկու խմբերը հսկվել են մեկ տարվա ընթացքում: Ստացված տվյալները համեմատվել են նույնատիպ 2 խմբերի տվյալների հետ, որոնք չեն զբաղվել մեթոդով:

Արդյունքներ և քննարկում: *Առաջին խմբում* (47 հոգի, ԽՇԿՎ և դեղորայքային հսկողություն) դիտվել են պիկֆլուումետրիայի կայուն ցուցանիշներ՝ ԱԳԱ>80%-ից, դեղորայքի դեղաչափերի նվազեցման հնարավորություն՝ 21 հոգի սերետալդի 250/50 դեղաչափը փոխարինել են 100/50-ով, լեյկոտրիենների ձևափոխիչները դադարեցրել են 4 հոգի: Հսկիչ խմբում սրացման 3 դեպքեր են գրանցվել՝ դեղաչափերի բացթողման, հոգեհուզական լարման պատճառով [14]:

Երկրորդ խմբում (38 հոգի) կայուն ախտադադարի մեջ գտնվող, ԽՇԿՎ մեթոդով զբաղվողների մոտ նկատվել է ֆիզիկական ծանրաբեռնվածության տանելիության բարձրացում, ախտադադարի փուլի երկարում, պիկֆլուումետրիայի կայուն ցուցանիշներ, արտաշնչման զագաթնակետային արագություն /ԱԳԱ/ =70-80%, տարվա ընթացքում հոսպիտալիզացիա չի կատարվել, (-2 ազոնիստների անհրաժեշտությունը շաբաթվա ընթացքում 2-3 անգամից պակաս է եղել: Հսկիչ խմբում-սալբուտամոլի ընդունում՝ օրվա ընթացքում 2-3 անգամ և ֆիզիկական ակտիվության սահմանափակում՝ 15 հոգու մոտ, 5 հիվանդներ հոսպիտալիզացվել են, որոնցից 3-ը տարվա ընթացքում 2 անգամ:



Նկ.1. Բուտելյոյի մեթոդը դեղորայքի հետ զուգակցված կիրառողների, միայն դեղորայքային հսկողության տակ գտնվողների, ռեմիսիայի /ախտադադարի/ փուլում գտնվող՝ մեթոդը կիրառող և չկիրառող անձանց տվյալների ԱԳԱ ցուցանիշների համեմատությունը (%):

Քանի որ և ալերգիկ ռինիտը [8] և հիպերվենտիլյացիոն համախտանիշը [12] կարող են ԲԱ-ի դրսևորման ռիսկի գործոն լինել, ուստի հիպերվենտիլյացիայի վերացումը կարևորվում է: Այսպիսով՝ չնայած ուսումնասիրությունները դեռ շարունակվում են, սակայն նախնական տվյալներից ստացված դրական արդյունքները թույլ են տալիս եզրակացնել, որ ԽՇԿՎ մեթոդը կարելի է կիրառել ԲԱ-ի, [1, 7] ալերգիկ ռինիտի և ԹԽՕՀ-ի վերականգնողական բուժման կոմպլեքսում:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

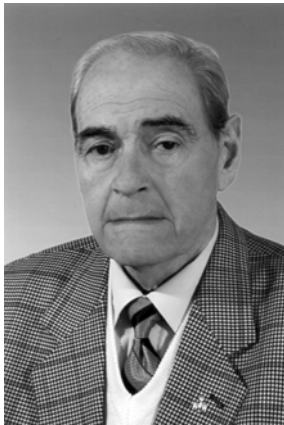
1. *Հակոբյան Հ.Ռ.* Հիպերվենտիլյացիոն համախտանիշի ախտորոշումը և բուժումը բրոնխիալ ասթմայով հիվանդների մոտ, Երևան, 104, էջ 18-98, 2008:
2. *Մաթևոսյան Հ.Հ.* Թոքաբանության դասընթաց, Երևան, էջ 162, 175, 2003:
3. *Այրապետова Н.С., Рассулова М.А., Нитченко О.В. и др.* Обоснование включения общих ванн с биолоном в лечебно-реабилитационный комплекс больных хронической обструктивной болезнью легких и бронхиальной астмой. Пульмонология. 3, с.73-77, 2012.
4. *Бутейко К.П.* Метод Бутейко-опыт внедрения в медицинскую практику. Одесса, 1991.
5. *Елисеев О.М.* Хронические обструктивные заболевания легких. Национальная программа. Тер.архив, 71, 5, с.78-81, 1999.
6. *Кассиль В.Л., Выжигина М.А., Лескин Г.С.* Искусственная и вспомогательная вентиляция легких, с. 74, 2004.
7. *Окорокова А.Н.* Диагностика болезней внутренних органов. М., с.40, 61, 2003.
8. *Окороков А.Н.* Лечение болезней внутренних органов, М., с.136, 2000.
9. *Приступа Л.Н., Фадеева А.А.* Механизмы взаимосвязи бронхиальной астмы и ожирения, с. 97-101, Пульмонология 3, 2012.
10. *Чучалин А.Г.* Бронхиальная астма, М., 2, с. 400, 1997.
11. *Чучалин А.Г.* Респираторная медицина, Руководство М., с.178-236, 2007.
12. *Brown R.D.Cratton C.* Reversebelety of air flow obstruction p. 586, 1986.
13. *Global Iniative for asthma.* publ.95-36-59, Respiratory group, 1991.
14. *Le Moual N., Varraso R., Siroux V. et al.* Domestic use of cleaning sprays and asthma activity in females. Eur. Respir journal, 1381-1389.
15. *Polly E. Parsons, John E.Heffner,* Pulmonary/ respiratory secrets p.125-138, 2007.
16. *Rijsenbeek-Nouwens L.H., Fiten K.B.Bron A.O. et al.* High-altitude treatment in atopic and nonatopic patients with severe asthmap12. Eur. Respiratory journal, p. 1374-1380, 2012.

Ստացվել է 20.12.2012



ԿԱՐԵՆ ՍՈՒՐԵՆԻ ՊՈՂՈՍՅԱՆ

Լրացավ Խաղողագործության, գինեգործության և պտղաբուծության գիտահետազոտական ինստիտուտի ֆիզիոլոգիայի և կենսաքիմիայի բաժնի վարիչ, ՀՀ ԳԱԱ ակադեմիկոս, կենսաբանական գիտությունների դոկտոր, պրոֆեսոր, հանրաճանաչ գիտնական-խաղողագործ՝ Կարեն Սուրենի Պողոսյանի 80-ամյակը:



Կ.Ս. Պողոսյանը, 1955թ. ավարտելով Մոսկվայի Լոմոնոսովի անվան պետական համալսարանը, գործուղվել է աշխատանքի Հայաստան և սկսած 1956 թ-ից, ավելի քան հինգ և կես տասնամյակ, աշխատում է Խաղողագործության, գինեգործության և պտղաբուծության գիտահետազոտական ինստիտուտում, ֆիզիոլոգիայի և կենսաքիմիայի բաժնում, իսկ 1974 թվականից՝ այդ բաժնի վարիչն է:

Կ.Ս. Պողոսյանն իր գիտական մկրտությունը ստացել է ակադեմիկոս Ն.Բ. Թումանովի լաբորատորիայում, ԽՍՀՄ ԳԱ ֆիզիոլոգիայի ինստիտուտում (Մոսկվա), 1961 թ. նրա ղեկավարությամբ պաշտպանելով թեկնածուական ատենախոսություն «Խաղողի վազի կոփման և ձմեռելու ֆիզիոլոգիական առանձնահատկությունները» թեմայով: Այդ հետազոտության մեջ հեղինակն առաջին անգամ բացահայտեց *V. vinifera* տեսակին պատկանող խաղողի սորտերի ֆիզիոլոգիական և կենսաքիմիական առանձնահատկությունները Հայաստանի խիստ կոնտինենտալ կլիմայական պայմաններում: Կ.Ս. Պողոսյանը 1970 թ.

ԽՍՀՄ Գյուղատնտեսության նախարարության կողմից գործուղվում է Ճապոնիա, որտեղ Հոկայդոյի ցածր ջերմաստիճանների ինստիտուտում 15 ամիս կատարում է մի շարք արժեքավոր հետազոտություններ խաղողի վազի և պտղատուների հյուսվածքների ցրտից վնասվելու մեխանիզմների պարզաբանման, նրանց ֆիզիոլոգիական վիճակի գենետիկական և ֆենոտիպային առանձնահատկությունների բացահայտման ուղղությամբ: Կ.Ս. Պողոսյանի այդ ուսումնասիրությունների արդյունքները զեկուցվել են ԽՍՀՄ-ի ամբողջ շարք խաղողագործական գիտահետազոտական ինստիտուտներում, գիտաարտադրական կենտրոններում հրավիրված գիտամեթոդական խորհրդակցություններում, ինչպես նաև արտասահմանյան միջազգային գիտաժողովներում:

Շարունակելով և ընդլայնելով այդ ուսումնասիրությունները, Կ.Ս. Պողոսյանը 1973 թ. պաշտպանում է դոկտորական ատենախոսություն, որում բազմակողմանիորեն հետազոտում է խաղողի վազի աճման և զարգացման առանձնահատկությունները հարավի խիստ կոնտինենտալ պայմաններում, բացահայտում է վազի վեգետացիայի և հանգստի շրջանում ի հայտ եկող ֆիզիոլոգիական և կենսաքիմիական փոփոխությունները, ցածր ջերմաստիճաններին խաղողի վազի դիմացկունության ձևավորումը, բույսի կոփման փուլերի անցման սպեցիֆիկան, ցրտադիմացկունության բարձրացմանը նպաստող ջերմաստիճանների ռեժիմը, միկրոկլիմայի և մի շարք այլ գործոնների ազդեցությունը:

Կ.Ս. Պողոսյանն առաջինն էր, ով տվեց խաղողի տարբեր ծագում ունեցող սորտերի ադապտացիոն ունակությունը կոփման և ձմեռման ընթացքում ցածր ջերմաստիճանների արագ փոփոխման պայմաններում, բացահայտեց վազի ջրակայուն վիճակը թույլացնող պատճառները, հիբրիդային սերնդում այդ հատկանիշի ժառանգման բնույթը, ինչպես նաև տարբեր ջերմաստիճանների ազդեցությունը խաղողի բույսի առանձին օրգանների վրա: Նա բացահայտեց վազի և պտղատեսակի հյուսվածքներում գերառեցման և սառցակալման գործընթացների առանձնահատկությունները, հյուսվածքների բջիջներում ջրակալման և ներջջային տարածություններում սառցակալման դինամիկայի միջև գոյություն ունեցող փոխադարձ կապը, պարզաբանեց այդ գործընթացների առանձնահատկությունները՝ կախված բույսի գենոտիպից և միջտեսակային ու ներտեսակային հիբրիդային սերունդներում դրանց ժառանգման

աստիճանից: Այս ուսումնասիրություններն իրենց արժանի արձագանքը գտան արտասահմանյան գիտական հանրության շրջանում, իսկ նրա կողմից մշակված խաղողի վազի և պտղատուների ցրտադիմացկունության աստիճանի արագ գնահատման լաբորատոր մոդելը լայն կիրառում ունեցավ մի շարք երկրների գիտահետազոտական և գիտաարտադրական կենտրոններում: Այն հնարավորություն էր տալիս արդեն առաջին 1-2 տարիների ընթացքում բազմակողմանիորեն գնահատելու սելեկցիոն նյութի ձմռադիմացկունության հատկանիշը, բացահայտելու գենոֆոնդի պոտենցիալ ցրտադիմացկունությունը:

Կ.Ս.Պողոսյանի ամբողջ գիտական գործունեությունը փաստորեն շարունակությունն ու զարգացումն էր ԽՍՀՄ ԳԱ ակադեմիկոս Մ.Ք.Չայլախյանի գիտական ավանդույթների՝ կապված բույսերի ֆիզիոլոգիական ակտիվ վիճակների հետազոտման հետ, ինչպես նաև վաստակաշատ գիտնական-սելեկցիոներ, ԽՍՀՄ Գյուղատնտեսական ԳԱ ակադեմիկոս Ս.Հ.Պողոսյանի գործունեության:

Կ.Ս.Պողոսյանը խաղողի ութ նոր ցրտադիմացկուն սորտերի համահեղինակ է: Նրա առաջարկած սորտերը շրջանացված են Հայաստանում և նրա սահմաններից դուրս (Ռուսաստան, Ուկրաինա, Մոլդովա): Դրանք օժտված են բարձր բերքատվությամբ, հիանալի հումք են տեսակավորված գինիների պատրաստման և խաղողի բարձրորակ հյութի ստացման համար:

Կ.Ս.Պողոսյանի բազմամյա գիտական գործունեության արդյունքները հրատարակվել են, ինչպես հայրենական, այնպես էլ արտասահմանյան մասնագիտական հանդեսներում, մասնավորապես՝ Ճապոնիայում, Բուսիայում, ԱՄՆ-ում: Նա մոտ 220 գիտական հրապարակումների և 2 մենագրության հեղինակ է: Նրա, խաղողի վազի ցրտադիմացկունության ֆիզիոլոգիական առանձնահատկությունները մենագրությունը (240 մամուլ ծավալով) 1984 թ. Համամիութենական Գյուղատնտեսական ԳԱ կողմից արժանացավ Կ.Ա.Տիմիրյազևի անվան ոսկե մեդալի, իսկ Բուլղարիայում հրատարակված, խաղողի ֆիզիոլոգիան և նրա մշակման հիմունքները գրքում ուրույն տեղ է գրավում Կ.Ս.Պողոսյանի կողմից ներկայացված մեծածավալ բաժինը (56 էջ):

Կ.Ս.Պողոսյանն ունի աշակերտների հզոր բանակ. նրա գիտական ղեկավարությամբ գիտությունների դոկտորի աստիճան են ստացել 4 գիտնական, մոտ ութ տասնյակ մասնագետներ (ինչպես Հայաստանում, այնպես էլ Ռուսաստանում, Մոլդովայում, Ուզբեկստանում, Բուլղարիայում) արժանացել են գիտությունների թեկնածուի գիտական աստիճանին:

Կ.Ս.Պողոսյանը 1985-2007 թթ. համատեղել է գիտական և մանկավարժական գործունեությունը, դասախոսելով ԵՊՀ-ի կենսաբանության ֆակուլտետի բուսաբանության, ինչպես նաև էկոլոգիայի և բնության պահպանության ամբիոններում:

Ակադեմիկոս Կ.Ս.Պողոսյանի բեղմնավոր գործունեությունն արժանացել է բարձր գնահատականի: Նրա կողմից սելեկցիոն ճանապարհով ստացված մի շարք սորտեր մրցանակների են արժանացել ինչպես միութենական, այնպես էլ միջազգային ցուցահանդեսներում (Էրֆուրտի միջազգային ցուցահանդեսում 8 ոսկե և 6 արծաթե մեդալների), իսկ տեխնիկական նոր սորտերի գինիների միջազգային համտեսների ժամանակ արժանացել են 9 ոսկե, 11 արծաթե մեդալների և առաջին կարգի 3 դիպլոմների: Ակադեմիկոս Կ.Ս.Պողոսյանը 1991 թ. Բուսիայի, 1994 թ. Բուլղարիայի գյուղատնտեսական գիտությունների ակադեմիաների թղթակից անդամ է, 1997 թ. Հայաստանի գյուղատնտեսական գիտությունների ակադեմիայի ակադեմիկոս, 1998 թ. խաղողագործության և գինեգործության միջազգային ակադեմիայի ակադեմիկոս, 2010 թ. Հայաստանի սպառողների ազգային ակադեմիայի պատվավոր անդամ:

Ակադեմիկոս Կարեն Սուրենի Պողոսյանն այսօր էլ շարունակում է իր ազգանվեր գործունեությունը՝ գիտելիքներն ու հարուստ փորձը հաղորդելով երիտասարդ մասնագետներին:

«Հայաստանի կենսաբանական հանդեսի» խմբագրություն



ՆՈՐ ԲԱՌԱՐԱՆ

Կենսաբանության ասպարեզում մասնագիտական բառարանների անհրաժեշտությունը դժվար է գերազնահատել, նկատի ունենալով գիտության ներկայիս բուռն զարգացումը, հատկապես ֆիզիկաքիմիական կենսաբանության, մոլեկուլային և բջջային կենսաբանության, գենետիկայի բնագավառներում հետազոտությունների աննախադեպ առաջընթացը և մասնագիտական նոր եզրույթների ի հայտ գալը: Բառարանի նշանակությունը ավելի է կարևորվում, եթե այն եռալեզու է, ծավալուն ու նախատեսված է նաև կենսաբանության հարակից բնագավառների՝ բժշկագիտության և գյուղատնտեսական գիտությունների մասնագետների, թարգմանիչների, ուսուցիչների, ուսանողների, աշակերտների համար: Այդպիսին է ՀՀ ԳԱԱ, Գիտությունն հրատարակչության կողմից դեռևս 2011 թվականին հրատարակված պրոֆեսոր Ա.Ա. Միմոնյանի և դոցենտ Ի.Հ. Բատիկյանի, Անգլերեն-ռուսերեն-հայերեն կենսաբանական բառարանը, որը ներառում է ավելի քան 80 000 եզրույթ:

Նմանատիպ աշխատության իրական գնահատականը ժամանակն է տալիս, երբ բառարանն աննկատ դառնում է անհրաժեշտություն և մշտապես ուղեկցում մասնագետին իր գիտակրթական գործունեության ընթացքում: Սակայն այսօր էլ կարող ենք փաստել, որ բառարանն, իրոք կարևոր երևույթ է մեր կենսաբանական հանրության համար և այն, անշուշտ, կգտնի իր ընթերցողին: Դրա մասին են վկայում արդեն-իսկ առկա դրական արձագանքները, որոնց թվում հատկապես գնահատելի է Մոսկվայի պետական համալսարանի ֆիզիկաքիմիական կենսաբանության ինստիտուտի տնօրեն, կենսաճարտարագիտության և կենսաինֆորմատիկայի ֆակուլտետի դեկան, Ռուսաստանի ԳԱ ակադեմիկոս Վ.Պ. Սկուլաչովի գրախոսականը, որտեղ մեծանուն գիտնականն իր գոհունակությունն է հայտնում և դրվատանքի խոսքեր ուղղում հեղինակներին (տես՝ «Голос Армении», №27 20240, 2012):

Գրախոսականում մասնավորապես նշվում է, որ եռալեզու բառարանն իր բովանդակությամբ, կենսաբանական անվանումների և եզրույթների քանակով յուրահատուկ մեծածավալ արժեքավոր աշխատություն է, բարեխիղճ աշխատանքի արդյունք, որտեղ ի մի է բերվել նյութի հավաքման, մշակման և նրա պատշաճ ներկայացման հեղինակների բազմամյա քրտնաջան աշխատանքը: Դրանում տեղ են գտել բույսերի և կենդանիների և նրանց ենթատեսակների անգլերեն, ռուսերեն և լատիներեն տարբերակներին համարժեք հայերեն եզրույթները: Ակադեմիկոսի կարծիքով, բառարանում առկա ավելի քան 80 000 եզրույթները լայն սպեկտր ունեն, վերաբերում են կենսաբանության տարբեր բնագավառներին և կարող են օգտագործվել գիտական տարաբնույթ հետաքրքրություններ ունեցող մասնագետների կողմից: Նշվում է, որ բառարանն անշուշտ կնպաստի կենսաբանության մեջ միասնական տերմինաբանության կիրառմանը, անգլերեն և ռուսերեն գիտական եզրույթների ճիշտ թարգմանությանը: Ակադեմիկոսը նաև հույս է հայտնում, որ այդ եռալեզու համապարփակ կենսաբանական բառարանից կարող են օգտվել ոչ միայն Հայաստանի, այլ նաև այլ երկրների մասնագետներ:

Հիրավի, արժանի գնահատական այդ արժեքավոր աշխատությանը:

«Հայաստանի կենսաբանական հանդեսի» խմբագրություն