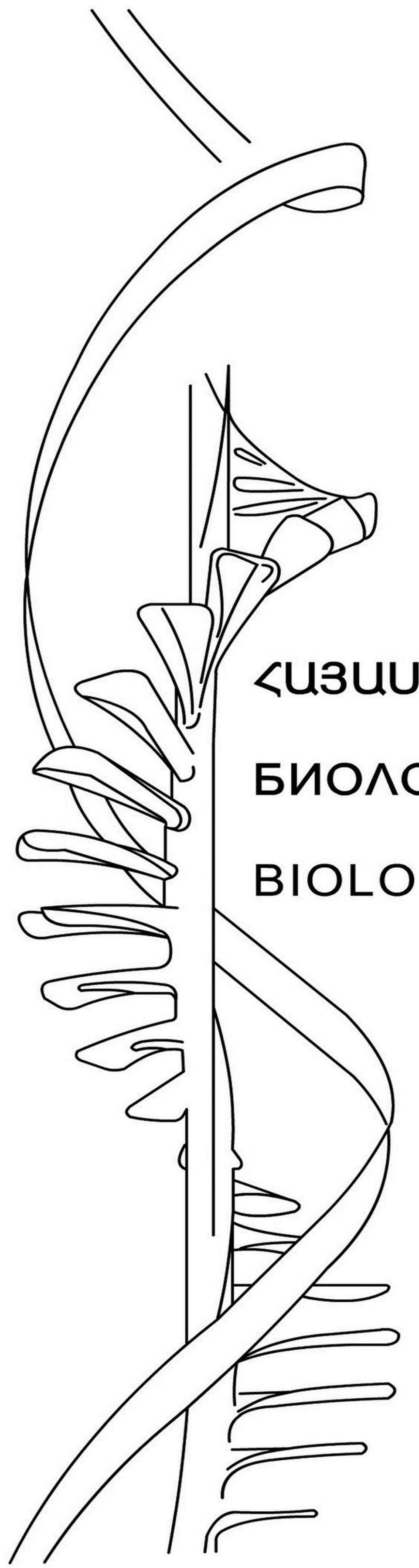
ISSN 0366-5119

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

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

ԽՄԲԱԳՐԱԿԱՆ ԿՈԼԵԳԻԱ
Է.Ս.Գևորգյան *(գլխավոր խմբագիր)*, Ռ.Մ.Հարությունյան *(գլխավոր խմբագրի տեղակալ)*, Ա.Ս. 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.Ց. Գաբրիելյան, Մ.Ա. Դավթյան, Ժ.Ի. Հակոբյան, Վ.Պ. Հակոբյան, Կ.Գ. Ղարագյոզյան, Ս.Հ. Մովսիսյան, Կ.Ս. Պողոսյան, Գ.Հ. Փանոսյան, Լ.Լ. Օսիպյան.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ
Э.С. Геворкян *(главный редактор)*, Р.М. Арутюнян *(заместитель главного редактора)*, А.С. Бояджян *(заместитель главного редактора)*,
А.Г. Есаян *(ответственный секретарь)*, Ж.А. Варданян, Г.А. Геворкян,
С.Х. Майрапетян, Л.Р. Манвелян, А.А. Трчунян

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ
В.П. Акопян, Ж.И. Акопян, Ю.Т. Алексанян,Э.Г. Африкян,
Э.Ц. Габриелян, М.А. Давтян, К.Г. Карагезян, С.О. Мовсесян,
Л.Л. Осипян, Г.А. Паносян, К.С. 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.

© Հայաստանի Կենսաբանական Հանդես, 2013
Биологический Журнал Армении, 2013
Biological Journal of Armenia, 2013

ԲՈՎԱՆԴԱԿՈՒԹՅՈՒՆ

Փորձարարական և տեսական հոդվածներ

Իզմաիլյան Ռ.Ա. Ինտեգրին β1-ը անհրաժեշտ է HeLa բջիջների ադհեզիային, տարածմանը և միգրացիային.......... 6

Մարգարյան Ա.Ա., Փանոսյան Հ.Հ., Բիրկելանդ Ն.Կ., Թռչունյան Ա.Հ. Ցածր ինտենսիվության միլիմետրային էլեկտրամագնիսական ալիքներով ճառագայթված պոլինուկ-լեոտիդների և որոշ կենսաբանորեն ակտիվ միացությունների կոմպլեքսագոյացման առանձնահատկությունները.. 11

Լանդո Դ.Յ., Գրիգորյան Ի.Է., Ֆրիդման Ա.Ս., Գալյուկ Ե.Ն., Դալյան Ե.Բ., Հարությունյան Ս.Գ. ԴՆԹ-ի ջերմակայունության կինետիկան ցիսպլատինի առկայությամբ... 14

Խաչիկյան Թ.Գ., Համբարյան Լ.Ռ., Հովաննիսյան Ռ.Հ., Մկրտչյան Ժ.Հ. Սևանա լճի հիմնական վտակների պլանկտոնային ջրիմուռների տեսակային բազմազանությունն ու էկոլոգիական բնութագիրը.................. 23

Մողրովյան Ա.Վ. Հայաստանի տարբեր մարզերից մթերված խնկածաղիկ սովորականի խոտի (*Herba Origani vulgaris*) մեջ ֆլավոնոիդների և դաբաղանյութերի որակաքանակական վերլուծությունը.. 28

Դիլբարյան Ա.Ս. Հիպօքսիայի ազդեցությունը առնետների լյարդի սպիտակուցների ամիդային խմբերի վրա........... 33

Վարդապետյան Հ.Ռ. Հունանյան Լ.Ս. Մոլեկուլային դինամիկայի մեթոդի կիրառումը բրոմական էթիդիումի և ԴՆԹ-ի փոխազդեցության ուսումնասիրությունում.. 37

Հովհաննիսյան Ա.Գ. Առնետների ուրցագեղձի բջջակորիզների ֆոսֆոլիպիդների բաղադրության փոփոխությունը ցիսպլատինի ազդեցությունից հետո... 42

Դավթյան Հ.Մ., Հովհաննիսյան Ս.Պ., Կարապետյան Հ.Մ., Դավթյան Մ.Ա. Ջրածնի պերօքսիդի ազդեցությունը *Aspergilus niger* R-3 բորբոսասնկերի օրնիտինային ցիկլի ֆերմենտների ակտիվության վրա................. 46

Մարգարյան Ա.Ա., Փանոսյան Հ.Հ., Բիրկելանդ Ն.-Կ., Թռչունյան Ա.Ա. Հայաստանի Սոթքի ոսկու հանքից մեկուսացված *Bacillus subtilis* AG4 շտամի ծանր մետաղներ կենսակուտակելու ունակությունը և *copA* ու *nikA* գեների էքսպրեսիան.. 51

Սապոնջյան Ե.Հ. Անիվի մեջ ամենօրյա կամավոր վազքը չի ազդում X-քրոմոսոմով պայմանավորված մկանային դիստրոֆիայով (mdx) մկան հետին վերջույթների բռնելու ուժի վրա.. 58

Հովսեփյան Տ.Ժ. Cu (II) (պիկոլինիլ-L-տրիպտոֆան) 2-ը որպես բազմաֆունկցիոնալ ռադիոպաշտպանիչ................. 63

Մովսեսյան Հ.Ս., Հարությունյան Ռ.Մ., Սահակյան Լ.Վ., Ասմարյան Շ.Գ., Գալստյան Հ.Մ., Բազիկյան Գ.Կ., Մարտիրոսյան Հ.Ա., Սաղաթելյան Ա.Կ. Քաղցկեղով հիվանդացության ուսումնասիրումը Երևան քաղաքում բնակվող երեխաների և երիտասարդների մոտ՝ կապված նրանց բնակության վայրում օդի և հողի աղտոտման հետ.. 69

Հովհաննիսյան Գ.Գ., Առաքելյան Վ.Բ., Անտոնյան Ա.Պ., Մինասյանց Մ.Վ., Վարդևանյան Պ.Հ. Կապման երկու տեղերով կորի վերլուծությունը փոքր հագեցումների տիրույթում....................................... 75

Մայրապետյան Ս.Խ.,Դարյադար Մ.Խ., Ալեքսանյան Ջ.Ս., Թադևոսյան Ա.Հ., Թովմասյան Ա.Հ., Ստեփանյան Բ.Թ., Գալստյան Հ.Մ. Նորագույն ջրաշիթային հիդրոպոնիկայի պայմաններում մի քանի եթերայուղատու մշակաբույսերի արդյունավետու թյան և կենսակտիվ նյութերի պարունակության համեմատական բնութագիրը... 80

Գևորգյան Է.Ս., Հովհաննիսյան Ա.Գ., Յավրոյան Ժ.Վ., Հակոբյան Ն.Ռ., Ղուկասյան Գ.Բ. Ցիսպլատինի *in vivo* ազդեցությունը առնետի լյարդի և ուրցագեղձի կորիզի մատրիքսի չեզոք լիպիդների վրա......................... 85

Սողոմոնյան Դ.Ռ. 51,8 և 53 գՀց հաճախականությամբ ցածր ինտենսիվությամբ էլեկտրամագնիսական ճառագայթման և հակաբիոտիկ ցեֆտազիդիմի ազդեցությունը *Lactobacillus acidophilus*-ի F_0F_1 ԱԵՖ ազային ակտիվության վրա.. 89

Վարդանյան Ա.Կ. Նոր մեկուսացված ջերմակայուն *Leptospiillum* spp. բակտերիաների ադհեզիան և պիրիտի կենսատարրալվացումը.. 93

Շալունց Շ.Վ., Ղազարյան Կ.Ա.,Գրիգորյան Կ.Վ. Որոտան գետի և նրա հիմնական վտակների ջրերի հիդրոքիմիական բնութագիրը և ոռոգելի հատկությունները.. 99

Մարմարյան Գ.Յու., Մարգարյան Գ.Ս. Հայաստանի տեղական այծերի կաթնային մթերատվությունը և կաթի ֆիզիկաքիմիական հատկություններ.. 107

Սարգսյան Ս.Մ., Բալայան Ա.Լ., Աճեմյան Լ.Հ. Գեզազարդի և զենկորի թունազրկման դինամիկան կարտոֆիլի պալարներում ու հողում և նրանց ազդեցությունը հողի շնչառության ակտիվության վրա.......................... 112

Բայրամյան Ն.Վ. *Paramecium caudatum* ինուզորիայի և էնցեֆալոմիոկարդիտի վիրուսի փոխհարաբերության ուսումնասիրումը... 116

Թումանյան Ա.Ա. Լոռվա սարահարթի ջրաճահճային ֆլորայի կարգաբանական վերլուծություն............................... 120

Հակոբյան Ա.Գ., Հովհաննիսյան Հ.Գ. Կոմպոստից մեկուսացված բակտերիաների ազդեցությունը *Agaricus bisporus*-ի սնկի աճի վրա լաբորատոր և փորձաարտադրական պայմաններում........................... 125

Հարությունյան Թ.Կ., Պետրոսյան Ռ.Կ., Դանիելյան Ֆ.Դ., Առաքելյան Մ.Ս. Էկոլոգիական գործոնների ազդեցությունը ժայռային մողեսների մակաբուծային վարակվածության վրա.. 130

• Համառոտ հաղորդումներ •

Դալլաքյան Մ.Վ., Եսոյան Ս.Ս., Հարությունյան Ֆ.Ա., Մելյան Գ.Հ., Եսայան Ա.Հ., Հովհաննիսյան Ն.Ա. Միկրոսատելիտային մարկերների կիրառումը խաղողի սեղանի սորտերի տնկիների մաքրասորտությանորոշման համար: Նախնական ուսումնասիրություններ.. 136

СОДЕРЖАНИЕ

•Экспериментальные и теоретические статьи•

Измаилян Р.А. Интегрин β1 необходим для адгезии, распространения и миграции HeLa клеток............ 6

Маргарян А.Ш. Особенности комплексообразования некоторых биологически активных соединений с полинуклеотидами, облученными миллиметровыми электромагнитными волнами низкой интенсивности...11

Ландо Д.Ю., Григорян И.Э., Фридман,А.С. Галюк Е.Н., Далян Е.Б., Арутюнян С.Г. Кинетика термостабильности ДНК в присутствии цисплатина... 14

Хачикян Т.Г., Гамбарян Л.Р., Оганесян Р.О., Мкртчян Ж.Г., Видовое разнообразие и экологическая характеристика планктонных водорослей основных притоков озера Севан.................................. 23

Могровян А.В. Качественный и количественный анализ содержания флавоноидов и дубильных веществ в траве душицы обыкновенной (*Herba Origani vulgaris*) флоры Армении...................... 28

Дилбарян А.С. Влияние гипоксиии на амидные группы белков печени крыс...33

Вардапетян Г.Р., Унанян Л.С. Метод молекулярной динамики в исследовании взаимодействия бромистого этидия с ДНК..37

Оганесян А.Г. Сдвиги в содержании фосфолипидов ядер клеток тимуса крыс после воздействия цисплатина...42

Давтян Р.М., Оганесян С.П.,Карапетян А.М, Давтян М.А. Влияние перекиси водорода на активность ферментов орнитинового цикла у плесневых грибов *Aspergillus niger R-3*................. 46

Маргарян А.А., Паносян О.А., Биркеланд Н.-К., Трчунян А.А. Биоаккумуляция тяжелых металлов и экспрессия генов *copA* и *nikA* в штамме *Bacillus subtilis* AG4, изолированного из Сотского месторождения золота Армении.. 51

Сапонджян Е.Г. Ежедневный добровольный бег в колесе не влияет на силу захвата задних конечностей мыши с мышечной дистрофией, связанной с X-хромосомой (*mdx*) 58

Овсепян Т.Ж. Cu (II) (пиколинил-L-триптофанат)2 как эффективный многофункциональный радиопротектор..63

Мовсесян А.С., Арутюнян Р.М., Саакян Л.В., Асмарян Ш.Г., Галстян А.М., Базикян Г.К., Мартиросян Э.А., Сагателян А.К. Изучение онкологической заболеваемости среди детей и молодежи в Ереване в связи с загрязнением воздуха и почвы в районах их местожительства..... 69

Оганесян Г.Г., Аракелян В.Б., Антонян А.П., Минасянц М.В., Вардеванян П.О. Анализ изотерм с двумя местами связывания в области малых заполнений..................................75

Майрапетян С.Х., Дарядар М.Х., Алексанян Дж.С., Тадевосян А.О., Товмасян А.О., Степанян Б.Т., Галстян А.М. Сравнительная характеристика продуктивности и содержания биоактивных веществ ряда эфиромасличных культур в условиях новейшей струйной гидропоники................. 80

Геворгян Э.С., Оганесян А.Г., Явроян Ж.Ж., Акопян Н.Р.,Гукасян Г.Б. In vivo воздействие цисплатина на состав нейтральных липидов печени и тимуса ядерного матрикса крыс............... 85

Согомонян Д.Р. Влияние низкочастотного электромагнитного излучения с частотами 51,8 и 53 ГГц и антибиотика цефтазидим на F_0F_1АТФ-азную активность *Lactobacillus acidophilus*.................... 89

Варданян А.К. Адгезия выделенных *Leptospirillum* spp. бактерий на пирите и биовыщелачивание железа... 93

Шалунц Ш.В., Казарян К.А. Григорян К.В. Гидрохимическая характеристика и ирригационные свойства вод реки Воротан и его основных притоков... 99

Мармарян Г.Ю.,Маркарян Г.С. Молочная продуктивность и физико-химические свойства молока местных коз Армении.. 107

Саргсян С.М., Балаян А.Л., Аджемян Л.А., Динамика детоксикации Гезагарда и Зенкора в клубнях картофеля и почве, их влияние на активность дыхания почвы......................................112

Байрамян Н.В. Изучение взаимодействия вируса энцефаломиокардита с инфузорией *Paramecium caudatum*...116

Туманян А.А. Таксономический анализ водно-болотной флоры Лорийского плато.....................................120

Акопян А.Г., Оганесян Г.Г. Влияние изолированных из компоста и энтомопатогенных бактерий на рост *Agaricus bisporus* в лабораторных и полупроизводственных условиях……………….......125

Арутюнян Т.К., Петросян Р.К., Даниелян Ф.Д., Аракелян М.С. Влияние экологических факторов на зараженность скальных ящериц паразитами……………………...…………………... 130

• Краткие сообщения •

Даллакян М.В., Есоян С.С., Арутюнян Ф.А., Мелян Г.Г., Есаян А.Г., Ованесян Н.А. Применение микорсателитных маркеров для сортовой идентификации посадочного материала столовых сортов винограда. Предварительный анализ…..……....................................136

CONTENTS

•Experimental and theoretical articles•

Izmailyan R.A. Integrin β1 requires for adhesion, spreading and migration of HeLa cells................................. 6

Margaryan A.Sh. Peculiarities of complex-formation of some biologically active compounds with polynucleotides irradiated by millimeter electromagnetic waves with low intensity…………….. 11

Lando D.Y., Grigoryan I.E., Galyuk E.N., Fridman A.S., Dalyan Y.B., Haroutiunian S.G. Kinetics of DNA thermal stability in the presence of cisplatin…………..….……………………………14

Khachikyan T.G., Hambaryan L.R., Hovhannisyan R.H., Mkrtchyan Zh. The plankton species variety and ecological characteristic of Lake Sevan main tributaries waters..23

Moghrovyan A.V. The qualitative and quantitative analysis of flavonoids and tannins containing in the herb of Oregano ordinary growing in RA flora………………………..…....………28

Dilbaryan A.S. The effect of hypoxia on the protein amid groups of rat liver..33

Vardapetyan H.R. Hunanyan L.S. The method of molecular dynamics in ethidium bromide-DNA interaction research..37

Hovhanisyan A.G. The changes in the content of total phospholipids in rat thymus nuclei after cisplatin action..... 42

Davtyan H.M., S.P. Hovhannisyan, H.M. Karapetyan, Davtyan M.A. Influence of hydrogen peroxide on enzymes of urea cycle in *Aspergilus niger* R3 fungus…..46

Margaryan A. A., Panosyan H.H., Birkeland N.K., Trchounian A.H. Heavy metal accumulation and the expression of the *copA* and *nikA* genes in *Bacillus subtilis* AG4 isolated from the Sotk Gold Mine (Armenia) ……………..…….…..................…………………………………..…... 51

Saponjian Y.H. Hind limb grip strength of X-chromosome-linked muscular dystrophy (*mdx*) mouse is not affected by daily voluntary wheel running.. 58

Hovsepyan T.Z. Cu (II) (picolinyl-L-tryptophan) 2 is an effecient multifunctional radioprotector……………... 63

Movsesyan H.S., Aroutounian R.M., Sahakyan L.V., Asmaryan Sh.G., Galstyan H.M., Bazikyan G.K., Martirosyan H.A., Saghatelyan A.K. Studying cancer incidence in kids and juveniles in Yerevan in relationship with air and soil pollution on their dwelling sites…………………………..... 69

Hovhannisyan G.G., Arakelyan V.B., Antonyan A.P., Minasyants M.V., Vardevanyan P.O. Analysis of isotherms with two binding sites in the region of small fillings.. 75

Mairapetyan S.Kh., Daryadar M.KH., Alexanyan J.S., Tadevosyan A.H., Tovmasyan A.H., Stepanyan B.T., Galstyan H.M. Comparative description of productivity and content of biologically active substances of some essential oil-bearing plants in conditions of new water stream hydroponics……... 80

Gevorgyan E.S. , Hovhanisyan A.G., Yavroyan Zh.V., Hakobyan N.R., Ghukasyan G.B. In vivo action of cisplatin on content of neutral lipids in rat liver and thymus nuclear matrix........................... 85

Soghomonyan D.R. The effects of low-intensity electromagnetic irradiation at the frequencies of 51.8 and 53 ghz and antibiotic ceftazidime ON *Lactobacillus acidophilus* F_0F_1 ATP-ase activity……………... 89

Vardanyan A.K. Adhezion of new isolated *Leptospirillum* spp. bacteria on pyrite in reference with iron bioleaching... 93

Shaluntc Sh. V., Ghazaryan K.A., Grigoryan K.V. Hydrochemical characteristics and irrigation properties of Vorotan river water and main tributaries……………..……............................ 99

Marmaryan G.Yu., Margaryan G.S. Milk productivity and physical and chemical composition of local goats of Armenia……………..….……………………………………………………..107

Sargsyan S.M. Balayan A.L., Atshemyan L.H. Dynamics of detoxification of Gezagard and Zencor in the potato tubes and the soil and their effect on the activity of soil respiration……………………... 112

Bayramyan N.V. Study of the interaction of the encephalomyocarditis virus with *Paramecium caudatum*..........116

Tumanyan A.A. Taxonomic analysis of Lori plateau wetland flora…...120

Hakobyan A.G., Hovhannisyan H.G. The impact on growth of *Agaricus bisporus* of bacteria isolated from compost in laboratory and small-scale producion conditions...125

Harutyunyan T.K., Petrosyan R.K., Danielyan F.D., Araqelyan M.S. The influence of environmental factors on parasite infection of rock lizards.. 130

• Short communications •

Dallakyan M.V., Yesoyan S.S., Harutyunyan F.A., Melyan G.H., Yesayan A.H., Hovhannisyan N.A. Application of microsatellite markers for varietal identification grape rootstocks: Preliminary analysis.. 136

Հայաստանի Գիտությունների Ազգային Ակադեմիա
Национальная Академия Наук Армении
National Academy of Sciences of Armenia

Հայաստանի Կենսաբանական Հանդես
Биологический Журнал Армении
Biological Journal of Armenia

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

Biolog. Journal of Armenia, 3 (65), 2013

INTEGRIN β1 REQUIRES FOR ADHESION, SPREADING AND MIGRATION OF Hela CELLS

R.A. IZMAILYAN

Laboratory of Cell Biology, Institute of Molecular Biology NAS RA, Yerevan, Armenia
Institute of Molecular Biology, Academia Sinica, Taipei, Taiwan, Republic of China
izmruzanna@gmail.com

Cell surface receptor integrin 1 plays important roles in signal transduction, focal adhesion formation, cell spreading and migration. This study shows that knockdown of integrin 1 in HeLa cells results disorganized actin cytoskeleton, impaired cell adhesion, spreading and migration. Outside-in activation experiment demonstrates that without integrin 1, cells can attach and spread to fibronactin but have a smaller shape and lacking protrusions, moreover attachment to laminin is poor and cells did not spread at all.

Integrin 1 – cell adhesion – fibronactin – laminin

Բջջի մակերևույթի ռեցեպտոր ինտեգրին β1-ը կարևոր դեր է խաղում ազդակի տրանսդուկցիայի, կենտրոնական ադհեզիայի կազմավորման, ինչպես նաև բջիջների տարածման և միգրացիայի ժամանակ: Տվյալ հետազոտությունը ցույց է տալիս, որ HeLa բջիջներում ինտեգրին β1-ի նոկդաունը բերում է ակտինային ցիտոսկելետոնի կառուցվածքի խախտմանը, թուլացնում է բջիջների ադհեզիան, տարածումը եւ միգրացիան: Դրսից-ներս ակտիվացիայի փորձը ցույց է տալիս որ HeLa բջիջները առանց ինտեգրին β1-ի կարող են կպնել և տարածվել ֆիբրոնեկտինի վրա սակայն ունեն ավելի փոքր ձևավորում և ելուստների բացակայում, դեռ ավելին նրանց ադհեզիան լամինինի հետ բավականին թույլ է, և բջիջները բոլորովին չեն տարածվում:

Ինտեգրին β1 – ադհեզիա – ֆիբրոնեկտին – լամինին

Рецептор поверхности клеток интегрин β1 играет важную роль в трансдукции сигнала, формировании фокальной адгезии, распластывании и миграции клеток. В работе показано, что нок-даун интегрина β1 в клетках HeLa приводит к дезорганизации актинового цитоскелетона, к уменьшению клеточной адгезии, распластывании и миграции клеток. Эксперименты по активизации "снаружи-внутрь" показали, что без интегрина β1 клетки могут прикрепляться и распространяться на фибронектин, но в этом случае они имеют малую форму и отсутствие выступов, более того, прикрепление к ламинину очень слабое, и клетки ничуть не распластываются.

Интегрин β1 – адгезия – фибронектин – ламинин

Integrins are a large family of cell surface receptors composed of 18 different and 8β subunits [7]. Integrin β1 is known to associate with multiple subunits including 1-11 and V and is widely distributed virtually in all mammalian cell types [7, 8, 10]. Through interaction with the extracellular matrices, integrin β1 regulates multiple aspects of cell biology, involves in many intracellular transduction activation pathways [8], They regulate both outside-in and inside-out signaling to maintain important cell functions related to cell adhesion, migration and survival [1-3] all of which are important processes for actin cytoskeleton organization [8, 12

Besides, studies have been reported that integrins are invol-ved in the invasion of many pathogens, viruses and bacteria. In our resent study by using mouse embryonic fibroblast lacking integrin β1 or si RNA knockdown approach in human cell line HeLa, we demonstrated that integrin β1 mediates Vaccinia virus endocytoses through Akt activation signaling, in both MEF and HeLa cells [6]. When we looked integrin β1 knockdown HeLa cells under microscopy we notice cell shape different compared to control knockdown HeLa cells. Phenomenon raised an interest and further investigated. Results demonstrate here that integrin β1 requires for actin organization, adhesion, spreading and migration in HeLa cells.

Materials and methods. *Cells, antibodies and reagents*. HeLa cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 2% penicillin/streptomycin (Gibco) in a 5% CO_2 incubator at 37°C. The anti-integrin β1 rat mAb, Mab13 was purchased from BD Pharmingen. Alexa Fluor 647 phalloidin and DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) were purchased from Invitrogen. Anti-β. actin antibody, fibronectin (FN) and Laminin-1 (LN) were purchased from Sigma-Aldrich. The integrin β1 small interfering RNA (siRNA) duplex (AAUGUAACCAACCGUAGCAUU) were purchased from Dharmacon Inc..

Confocal immunofluorescence microscopy. The KD HeLa cells (si-control or si-ITGβ1) were seeded on glass cover slips ($7x10^4$) in 12-well plates. The next day after being washed once with PBS cells were fixed using 4% paraformaldehyde, permeabilized (0,2% BSA/Saponin) and stained with Alexa Fluor 647 phalloidin for 1 hr at room temperature, cells were then washed 3 times with PBS stained with DAPI for 5 min. Cells were mounted in Vectashield medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA) and images were collected with an LSM510 Meta Confocal Laser Scanning Microscope (Carl Zeiss) using a 63x objective lens.

Integrin β1 siRNA. HeLa cells were either mock-transfected (si-control) or transfected with siRNA duplexes (20 nM) targeting integrin β1 (si-ITGβ1) using the Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) as described previously (5, 6)

Cell spreading and adhesion assays. Spreading and adhesion assays were performed as described previously (2, 11). In brief, non-tissue culture grade 96-well plates (FALCON) were coated with fibronectin (FN) or laminin-1 (LN-1) at 20 μg/ml in 50μl volume overnight at 4°C, the next day coated wells were washed once with PBS and blocked with PBS containing 1% BSA at 37°C for 1 to 2hrs. While blocking the coated substrates cell suspension were prepared. HeLa KD cells (si-control and si-ITGβ1) that were grown to confluency and serum starved for 2hrs were detached from the culture dish by trypsin/EDTA spin, washed once, suspended in serum free DMEM $2x10^4$ cells per well was added to the substrates and incubated at 37°C for various time. Non adhered cells were washed out and attached cells were fixed with 95% ethanol for 10 min at RT stained with crystal violet for 30 min, after being washed with water images were collected with Nikon inverted microscope, or for colorimetric analyses 0.2% Triton X-100 was added to the stained cells for 5 min at RT then OD in 550 nm was measured in an ELISA reader.

Wound healing assay. Indicated cells were seeded in tissue culture dish and grown for ~100% confluency then cell monolayer were wounded using pipette tip, cells were washed once with PBS to remove wounded cell debris and incubated with complete medium at 37°C. Images were collected with Nikon inverted microscope at 0 hrs (right after wounding) or 24 hrs of incubation.

Results and Discussion. Numerous studies have been described the important role and the function of integrin β1 on cellular morphological changes in mouse model [1, 2]. To test weather integrin β1 requires for actin cytoskeleton organization in HeLa cells, small interfering RNA experiments were conducted to knockdown β1 from HeLa cells. To check siRNA quality first, control siRNA (si-control) or siRNA targeting integrin β1 (si-ITGβ1) was transfected into HeLa cells, followed by harvesting for immunoblot analyses (fig. 2B) and FACS analyses (data not shown). Total amount of integrin β1 was knocked down (KD) in si-ITGβ1 but not in si-control HeLa cells, conforming specificity of si-ITGβ1 (fig. 2B). These HeLa KD cells were grown in glass cover slips in compleat medium over night fixed for immunofluorescence microscopy analyses (fig.1A) as determine by phalloidin staining

si-ITGβ1 KD HeLa cells showed rounded shape, disorganized actin staining lacking pro trusions compare to si-control KD cells. Indicating integrin β1 is important for HeLa cell morphological organization.

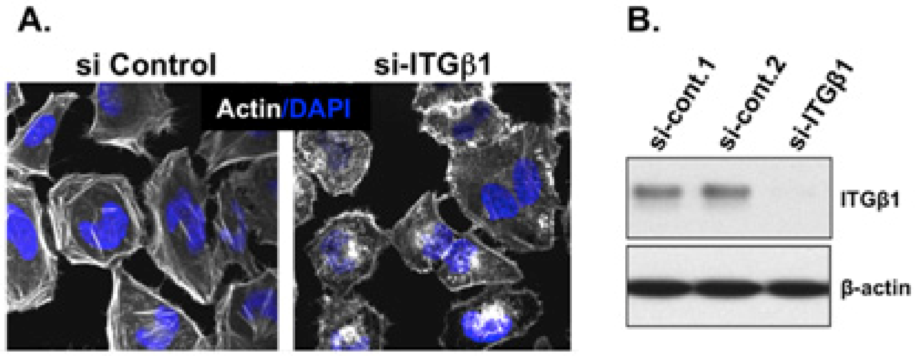


Fig. 1. Altered cell morphology upon integrin β1 knockdown in HeLa cells.(A) Immunofluorescence analysis of actin in KD HeLa cells. The KD HeLa cells mock-KD (si-Control) and si-ITGβ1 KD cells were fixed permeabilized and stained with Alexa Fluor 647-phalloidin (white) to mark the cell body and DNA was visualized by DAPI staining (blue). (B) Immunoblots of lysates prepared from mock-KD (si-Cont.1 and 2) and si-ITGβ1 KD HeLa cells using anti-ITGβ1 (Mab13) or anti-β-actin antibodies as loading control.

Integrins mediate dynamic interactions between the extracellular matrix and the actin cytoskeleton. The ability of integrins to mediate multiple inside-out and outside-in signaling pathways is essential to maintain the normal cell functioning: viability, adhesion, migration and growth. The Integrin 1 plays a crucial role in cell-to-cell and cell-to-matrix communications [4, 9]. Previously we performed outside-in activation experiments to turn-on the integrin dependent signaling pathway in inactive HeLa cells and we showed that upon activation on fibronactin and Laminin several integrin 1 downstream signaling like FAK, Akt and Erk are phosphorylated [6].

To address if integrin 1 is essential to mediating HeLa cell activation on extracellular matrix proteins were performed adhesion and spreading experiments from HeLa KD cells. Serum starved HeLa si-control and si-ITG 1 KD cells were seeded overnight in the complete medium. The next day cells were serum starved detached from culture dish with trypsin/EDTA and plated onto substrates coated with fibronactin (FN) and Laminin (LN) for 60 min.

Although both, si-control and si-ITG 1 KD cells adhere and spread to FN (fig. 2A-ab) however, si-ITG 1 KD cells have smaller shape as was seen in fig. 1A. In contrast, si-ITG 1 KD cells attached to Laminin poorly and those attached cells did not spread at all (fig. 2A-cd).

This difference was still obvious when cells were incubated even longer 120 min. (data not shown). Indicating integrin 1 binding to laminin is crucial for HeLa cells attachment and spreading. As a negative control cells were plated onto dishes coated with PBS/BSA (fig. 2A-ef). Consistent result was obtained when adhesion assay was repeated using GD25 cells, MEF lacking integrin 1 [2, 6] (data not shown). Earlier studies with GD25 cells showed that without integrin 1 these cells attachment to fibronactin is through v 3 receptor, whether it is also true for HeLa cells remain to identify.

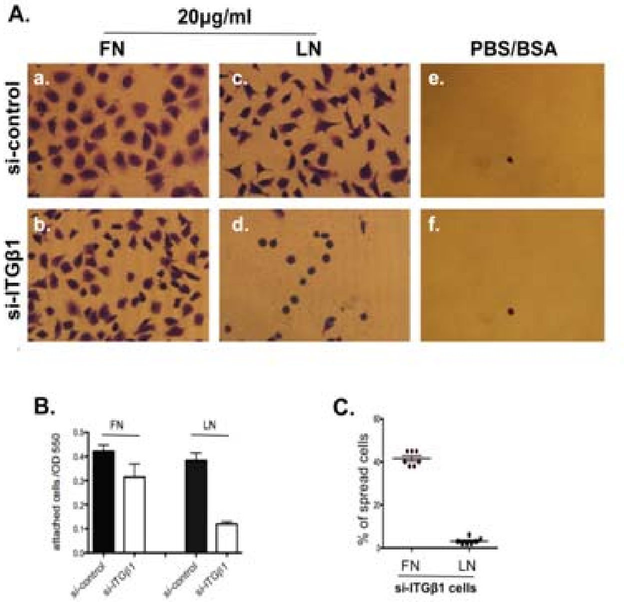


Fig. 2. Adhesion and spreading of the si-control and si-ITGβ1 KD HeLa cells seeded on substrate coated with fibronactin or Laminin-1. (A) Morphology of the cells. Non tissue culture plates were coated with 20 g/ml fibronactin (FN) or laminin-1 (LN) blocked with 1% BSA cells were incubated at 37°C for 60 min, fixed stained and photographed. (see Material and Methods) (B). Quantification of adhered cells. (C) Quantification of si-ITGβ1 KD HeLa cells spread on LN. Graph analyses were performed using Prism software (GraphPad).

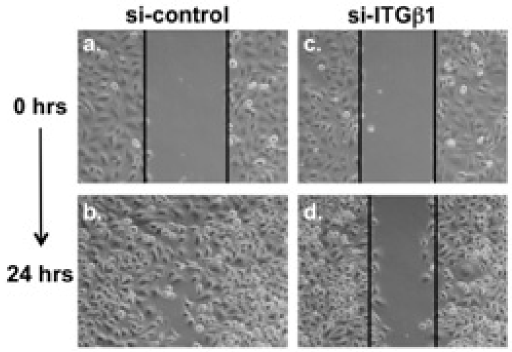


Fig. 3. Migration of si-control and si-ITGβ1 KD HeLa cells. Confluent cell monolayer was wounded and photographed ether right after wounding 0 or 24 hrs post incubation

Adhesion is a complex mechanism and involves variety processes like cell migration, invasion, wound healing and tissue remodeling. Effect of integrin 1 was examined in migration assay. Confluent monolayer of HeLa si-control and si-ITG 1 KD cells were wounded and incubated for indicated time as shown in fig. 3 only in the presence of integrin 1 cells were able to migrate and repair the wound (fig. 3ab) in contrast to si-ITG 1 cells (fig. 3cd). Resent years HeLa cells are commonly used and important cell line for the researchers in molecular and cellular biology field which makes an interest to know more about these cell biology. More works can be done to investigate and dissect which downstream signaling and receptors are directly involved for integrin 1 function in HeLa cells.

Acknowledgements. Thanks to Prof. Wen Chang (Institute of Molecular Biology, Academia Sinica, Taiwan, R.O.C) for useful suggestions on experimental designing. I also thank Prof. Anna Boyajyan and Dr. Zaven Karalyan (Institute of Molecular Biology, NAS, Armenia) on suggestions and comments during manuscript preparation. This work was supported by grants from Academia Sinica and the National Science Council of the R.O.C. (NSC-100-2320-B-001-006).

REFERENCES

1. *Abraham, S., N. Kogata, R. Fassler, and R.H.* Adams. Integrin beta1 subunit controls mural cell adhesion, spreading, and blood vessel wall stability. Circ. Res., *102*, 562-70, 2008.
2. *Fassler, R., J. Martin Pfaff, ohn Murphy, A.A., S.J. Noegel, *, and a. R.A. Rupert Timpl*. Lack of 1 Integrin Gene in Embryonic Stem Cells Affects Morphology, Adhesion, and Migration But Not Integration into the Inner Cell Mass of Blastocysts. Journal of Cell Biology, *128*, 979-988, 2005.
3. *Grose, R., C. Hutter, W. Bloch, Thorey, F. M. Watt, R. Fassler, C. Brakebusch, and S. Werner.* A crucial role of β1 integrins for keratinocyte migration *in vitro* and during cutaneous wound repair. Development, *129*, 2303-2315, 2002.
4. *Harburger, D.S., and D.A. Calderwood*. Integrin signalling at a glance (vol 122, pg. 159, 2009). Journal of Cell Science, *122*, 1472-1472, 2009.
5. *Huang, C.Y., T.Y. Lu, C.H. Bair, Y.S. Chang, J.K. Jwo, and W. Chang.* A novel cellular protein, VPEF, facilitates vaccinia virus penetration into HeLa cells through fluid phase endocytosis. Journal of Virology, *82*, 7988-7999, 2008.
6. *Izmailyan, R., J.C. Hsao, C.S. Chung, C.H. Chen, P.W. Hsu, C.L. Liao, and W. Chang*. Integrin 1 mediates vaccinia virus entry through activation of PI3K/Akt signaling. J. Virol., *86*, 6677-87, 2012.
7. *Johnson, M. S., N. Lu, K. Denessiouk, J. Heino, and D. Gullberg.* Integrins during evolution: Evolutionary trees and model organisms. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes, *1788*, 779-789, 2009.
8. *Legate, K. R., E. Montanez, O. Kudlacek, and R. Fassler.* ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling. Nature Reviews Molecular Cell Biology, *7*, 20-31, 2006.
9. *Morgan, M.R., M.J. Humphries, and M.D. Bass*. Synergistic control of cell adhesion by integrins and syndecans. Nature Reviews Molecular Cell Biology, *8*, 957-969, 2007.
10. *Tarone, G., M.A. Russo, E. Hirsch, T. Odorisio, F. Altruda, L. Silengo, and G. Siracusa.* Expression of Beta-1 Integrin Complexes on the Surface of Unfertilized Mouse Oocyte. Development, *117*, 1369-1375, 1993.
11. *Wennerberg, K., A. Armulik, T. Sakai, M. Karlsson, R. Fassler, E.M. Schaefer, D.F. Mosher, and S. Johansson.* The cytoplasmic tyrosines of integrin subunit beta 1 are involved in focal adhesion kinase activation. Molecular and Cellular Biology, *20*, 5758-5765, 2000.
12. *Wiesner, S., K.R. Legate and R.* Fassler. Integrin-actin interactions. Cellular and Molecular Life Sciences, *62*, 1081-1099, 2005.

Received on 17.06.2013

Հայաստանի Գիտությունների Ազգային Ակադեմիա
Национальная Академия Наук Армении
National Academy of Sciences of Armenia

Հայաստանի Կենսաբանական Հանդես
Биологический Журнал Армении
Biological Journal of Armenia

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

Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 3(65), 2013

ՑԱԾՐ ԻՆՏԵՆՍԻՎՈՒԹՅԱՆ ՄԻԼԻՄԵՏՐԱՅԻՆ ԷԼԵԿՏՐԱՄԱԳՆԻՍԱԿԱՆ ԱԼԻՔՆԵՐՈՎ ՃԱՌԱԳԱՅԹՎԱԾ ՊՈԼԻՆՈՒԿԼԵՈՏԻԴՆԵՐԻ ԵՎ ՈՐՈՇ ԿԵՆՍԱԲԱՆՈՐԵՆ ԱԿՏԻՎ ՄԻԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԿՈՄՊԼԵՔՍԱԳՈՅԱՑՄԱՆ ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

Ա.Շ. ՄԱՐԳԱՐՅԱՆ

Երևանի պետական համալսարանի Իջևանի մասնաճյուղ,
sci_ib@ysu.am

Ուսումնասիրվել են ջրի ռեզոնանսային հաճախություններով միլիմետրային ալիքներով ճառագայթված poly[d(I-C)](poly[d(I-C)] և poly[d(G-C)](poly[d(G-C)] պոլինուկլեոտիդների հետ միտոքսանտրոն և էթիդիումի բրոմիդ կենսաբանական ակտիվ միացությունների կապումը և կոմպլեքսագոյացման հետևանքով համակարգի թերմոդինամիկական պարամետրերի փոփոխությունները: Ստացված արդյունքներից երևում է, որ 64.5 ԳՀց հաճախությամբ ճառագայթելու դեպքում այս միացություններն ավելի ,ամուրե են կապվում ԴՆԹ-ին, ինչով պայմանավորված է դրանց հակաուռուցքային ակտիվությունը:

poly[d(I-C)](poly[d(I-C)] - poly[d(G-C)](poly[d(G-C)] – միտոքսանտրոն – էթիդիումի բրոմիդ – ջրի ռեզոնանսային հաճախություններ

Исследованы связывание биологически активных соединений – митоксантрона и бромистого этидия с poly[d(I-C)].poly[d(I-C)] и poly[d(G-C)].poly[d(G-C)], облученных миллиметровыми волнами с резонансными частотами воды, а также изменения термодинамических параметров системы вследствие комплексообразования. Из полученных результатов видно, что при облучении частотой 64.5 ГГц эти соединения связываются с ДНК “прочнее”, чем обусловлена их противоопухолевая активность.

poly[d(I-C)].poly[d(I-C)] - poly[d(G-C)].poly[d(G-C)] – митоксантрон – бромистый этидий – резонансные частоты воды

In present work the binding of biologically active compounds – mitoxantrone and ethidium bromide with poly[d(I-C)].poly[d(I-C)] and poly[d(G-C)].poly[d(G-C)] irradiated by millimeter waves with water resonant frequencies as well as the changes of thermodynamic parameters of system after complex-formation have been investigated. It is obvious from obtained results that at irradiation by 64.5 GHz frequency these compounds bind to DNA «firmly» by which their anti-tumorous activity is conditioned.

poly[d(I-C)].poly[d(I-C)] - poly[d(G-C)].poly[d(G-C)] – mitoxantrone – ethidium bromide – water resonant frequencies

Կենսահամակարգերի վրա կարճալիք էլեկտրամագնիսական ալիքների ազդեցության ուսումնասիրությունները վկայում են, որ կախված ճառագայթման հաճախությունից, ցածր (ոչ ջերմային) ինտեսիվության միլիմետրային էլեկտրամագնիսական (ՄԷՄ) ալիքները կարող են խթանել կամ արգելակել կենդանի օրգանիզմում ընթացող տարբեր կենսաքիմիական պրոցեսները [3, 5]:

Աշխատանքում ուսումնասիրվել է ջրի մոնոմոլեկուլային կառուցվածքի տատանումների ռեզոնանսային հաճախականություններով ճառագայթված poly[d(I-C)](poly[d(I-C)] և poly[d(G-C)](poly[d(G-C)] պոլինուկլեոտիդների և միտոքսանտրոն ու էթիդիումի բրոմիդ կենսաբանական ակտիվ միացությունների կապման պրոցեսը և կոմպլեքսագոյացման հետևանքով համակարգի թերմոդինամիկական պարամետրերի փոփոխությունները:

Նյութ և մեթոդ: Աշխատանքում օգտագործվել են կրկնակի պարույրային poly[d(I-C)](poly[d(I-C)] և poly[d(G-C)](poly[d(G-C)] պոլինուկլեոտիդներ (“P.L. Biochemicals”) և միտոքսանտրոն ու էթիդիումի բրոմիդ (“Sigma”): Չափումները կատարվել են 0.1M Տրիս բուֆերում (pH 7.5), 27^0C ջերմաստիճանում: Նմուշների կոնցենտրացիան որոշվել է կլանման գործակցի միջոցով (M^{-1} $սմ^{-1}$). poly[d(I-C)](poly[d(I-C)]-ի համար ($_{251}$(P)=6900, poly[d(G-C)](poly[d(G-C)]-ի համար ($_{254}$(P)=7100, միտոքսանտրոնի՝ ($_{665}$=20900 և էթիդիումի բրոմիդի համար ($_{480}$=5850: Նմուշների ճառագայթումը և սպեկտրոսկոպիկ չափումների ընթացքը մանրամասը նկարագրված է [4]: Ֆլյուորեսցենցիայի սպեկտրերը ստացվել են “Perkin Elmer MPF-3” սպեկտրոֆլյուորիմետրի միջոցով [2]: Պոլինուկլեոտիդների ջուր-աղային լուծույթները ճառագայթվել են 20, 40, 60 րոպե տևողությամբ 64.5 ԳՀց հաճախությամբ, որը համապատասխանում է ջրի մոնոմոլեկուլային կառուցվածքի տատանումների ռեզոնանսային հաճախության հետ:

Արդյունքներ և քննարկում: Ստացվել են չճառագայթված և 40 ու 60 րոպե ճառագայթված պոլինուկլեոտիդների հետ նշված կենսաբանական ակտիվ միացությունների կոմպլեքսների կլանման և ֆլյուորեսցենցիայի սպեկտրերը՝ տեսանելի տիրույթում (որտեղ պոլինուկլեոտիդը չի կլանում) միացությունների տարբեր հարաբերական կոնցենտրացիաների դեպքում: Կլանման սպեկտրերից և ֆլյուորեսցենցիայի սպեկտրերից կառուցված կապման իզոթերմերից որոշվել են *K* և *n* պարամետրերի արժեքները [2], որտեղից հետևում է, որ միտոքսանտրոն ու էթիդիումի բրոմիդ կենսաբանական ակտիվ միացությունները չճառագայթված և ճառագայթված պոլինուկլեոտիդների հետ փոխազդում են հիմնականում ինտերկալյացիոն մեխանիզմով: Կապման իզոթերմերից որոշված K կապման հաստատունի և կոմպլեքսի թերմոդինամիկական պարամետրերի փոփոխության արժեքները բերված են աղ. 1-ում:

Մեր հաշվարկները ցույց են տալիս, որ կոմպլեքսների թերմոդինամիկական պարամետրերի փոփոխությունը կախված է ճառագայթման տևողությունից և առավելագույնն է 60 րոպե ճառագայթման դեպքում: Այդ պատճառով աղյուսակում բերված են միայն 60 րոպե ճառագայթմանը համապատասխանող արժեքները: Աղ.1-ում բերված պոլի poly[d(G-C)](poly[d(G-C)] պոլինուկլեոտիդի հետ միտոքսանտրոնի և էթիդիում բրոմիդի կապման հետևանքով թերմոդինամիկական պարամետրերի փոփոխության արժեքները թույլ են տալիս պարզաբանել գուանինի ինոզինով ձևափոխելիս կոմպլեքսագոյացման հնարավոր առանձնահատկությունները: Համեմատենք չճառագայթված պոլինուկլեոտիդների հետ միտոքսանտրոն հակաուռուցքային դեղամիջոցի կապման պարամետրերի արժեքները: Աղ. 1-ից հետևում է, որ միտոքսանտրոնը ավելի ամուր կոմպլեքս է առաջացնում poly[d(G-C)](poly[d(G-C)]-ի հետ, չնայած poly[d(I-C)](poly[d(I-C)]-ի դեպքում զույգ մոնոմերային միավորների հետ կապվում են ավելի շատ թվով միտոքսանտրոնի մոլեկուլներ: Ճառագայթված պոլինուկլեոտիդը միտոքսանտրոնի հետ առաջացնում է ավելի կայուն կոմպլեքս (մեծանում է K-ն և թերմոդինամիկական պարամետրերի փոփոխության բացարձակ արժեքները), անփոփոխ n-ի դեպքում: Ուռուցքածին էթիդիում բրոմիդ միացությունը,որը միտոքսանտրոնի նման ԴՆԹ-ի հետ փոխազդում է ինտերկալյացիոն մեխանիզմով, ավելի ամուր կամպլեքս է առաջացնում poly[d(G-C)](poly[d(G-C)]-ի հետ. Սակայն ինչպես վկայում են աղ.1-ում բերված թերմոդինամիկական պարամետրերի արժեքները ճառագայթման հետևանքով կոմպլեքսի կայունության աճի մեծությունը գտնվում է չափման սխալի սահմաններում: Հետևաբար, ընդհանրացնելով փորձնական տվյալները, կարելի է պնդել, որ գուանինի ինոզին մոդիֆիկացիայի հետևանքով, չնայած ԴՆԹ մոլեկուլի վրա գոյանում են կառուցվածքային անկայուն տեղամասեր “դեֆեկտներ”, միտոքսանտրոնի ու էթիդիում բրոմիդի ԴՆԹ-ի հետ կապման հաստատունները նվազում են. աճում են ԴՆԹ-ի զույգ մոնոմերային միավորների հետ կապված կենսաբանական ակտիվ միացությունների թիվը: ԴՆԹ-ի մոլեկուլը 64.5 ԳՀց հաճախությամբ ճառագայթելիս այդ միացությունները ավելի ամուր են կապվում ԴՆԹ-ի մոնոմերային միավորների հետ, որով և պայմանավորված են նրանց հակաուռուցքային ակտիվությունը:

Աղ.1. Կապման հետևանքով համակարգի թերմոդինամիկական պարամետրերի փոփոխության արժեքները որոշված 27^{0}C ջերմաստիճանում: Ճառագայթման տևողությունը կազմում է 60 րոպե (աղյուսակում բերված արժեքները հանդիսանում է 5-6 չափումների միջինը)

Կոմպլեքսի տեսակը	K.10^{-5} M^{-1}	-ΔG կկալ/մոլ	-ΔH կկալ/մոլ	ΔS կկալ/մոլ,Կ	n
Չճառագայթված poly[d(I-C)]. poly[d(I-C)]-միտոքսանտրոն	2.1±0.2	7.5±0.2	2.6±0.1	15.0±0.2	2
Ճառագայթված poly[d(I-C)].poly[d(I-C)]-միտոքսանտրոն	3.6±0.2	7.8±0.2	2.8±0.1	15.3±0.2	2
Չճառագայթված poly[d(I-C)].poly[d(I-C)]-էթիդիումի բրոմիդ	2.5±0.2	7.6±0.2	2.6±0.1	15.1±0.2	1.5
Ճառագայթված poly[d(I-C)].poly[d(I-C)]-էթիդիումի բրոմիդ	2.6±0.2	7.6±0.2	2.6±0.1	15.2±0.2	1.5
Չճառագայթված poly[d(G-C)].poly[d(G-C)]-միտոքսանտրոն	13.5±0.2	8.6±0.2	4.1±0.2	17.2±0.2	2.5
Ճառագայթված poly[d(G-C)].poly[d(G-C)]-միտոքսանտրոն	15.1±0.3	8.7±0.2	4.2±0.2	17.6±0.2	2.5
Չճառագայթված poly[d(G-C)] .poly[d(G-C)]-էթիդիումի բրոմիդ	7.6±0.2	8.3±0.2	3.1±0.2	16.2±0.2	2
Ճառագայթված poly[d(G-C)]. poly[d(G-C)]-էթիդիումի բրոմիդ	7.8±0.2	8.3±0.2	3.1±0.2	16.3±0.2	2

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. *Քանարյան Գ.Լ., Ղազարյան Ռ.Ս., Թադևոսյան Ա.Ա., Բաբայան Ս.Յու.* Միտոքսանտրոն և ամետանտրոն հսկուռուցքային դեղամիջոցների փոխազդեցությունը ճառագայթված ԴՆԹ-ի հետ: Գիտական հոդվածներ, Վանաձոր, էջ 137-144, 2012:
2. *Бабаян Ю.С.* Конформационное состояние молекул poly[d(I-C)].poly[d(I-C)] в водных растворах. Мол. биология, *25*, 1, с. 388-395, 1991.
3. *Калантарян В.П., Бабаян Ю.С., Нерсесян Л.Э., Гаробян Д.В.* Влияние миллиметрового излучения на ДНК опухолевой клетки *in vivo*. Биомедицинская радиоэлектроника, *12*, с. 12-16, 2010.
4. *Kalantaryan V.P., Babayan Yu.S., Gevorgyan E.S.* Influence of low intensity coherent electromagnetic millimeter radiation on aqua solution of DNA. Prog. Electromag. Res. Let., 13, p. 1-9, 2010.
5. *Tadevosyan A.A., Ghazaryan R.S., Kanaryan G.A., Babayan Yu.S. In vivo* influence of non-thermal coherent millimeter electromagnetic wave radiation on DNA of tumor tissue. Molecular and cellular biology, *3*, p. 193-196, 2012.

Ստացվել է 09.04.2013

Հայաստանի Գիտությունների Ազգային Ակադեմիա
Национальная Академия Наук Армении
National Academy of Sciences of Armenia

Հայաստանի Կենսաբանական Հանդես
Биологический Журнал Армении
Biological Journal of Armenia

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

Biolog. Journal of Armenia, 3 (65), 2013

KINETICS OF DNA THERMAL STABILITY IN THE PRESENCE OF CISPLATIN

D.Y. LANDO[1], I.E. GRIGORYAN[2], E.N. GALYUK[1], A.S. FRIDMAN[1], Y.B. DALYAN[2], S.G. HAROUTIUNIAN[2]

[1]Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus
[2]Faculty of Physics, Department of Molecular Physics, Yerevan State University
lando@iboch.bas-net.by

Antitumor drug cisplatin forms in DNA intermediate monofunctional and final bifunctional adducts that produces strong structural distortions to the double helix. To study the influence of both distortions on DNA thermal properties, we have monitored $\delta T_m(t)$ that is the time dependence of a change in DNA melting temperature under incubation with cisplatin. Cisplatin/nucleotide molar ratio was 0.01 to 0.1, incubation was carried out in 0.01 M $NaClO_4$. Previously found alkaline conditions were used for melting experiments. The alkaline medium makes the thermal effect of cisplatin much stronger and prevents further transformation of intermediate monofunctional adducts under heating. Processing of the experimental curves $\delta T_m(t)$, modeling of adduct formation and of the dependence $\delta T_m(t)$ were carried out. It has been found that, at t<8 min, only monofunctional adducts originated from initially monoaquated cisplatin influence $\delta T_m(t)$. Their concentration is highest and impact on thermal stability is maximal at t=8 min. For 8 min<t<10 h, a change in $\delta T_m(t)$ is mainly caused by accumulation of bifunctional adducts, although there is some influence of intermediate monofunctional adducts arisen from initially non-dissociated cisplatin. Only bifunctional adducts influence $\delta T_m(t)$ at t>10 hours. Kinetic and thermal characteristics of both intermediate monofunctional and final bifunctional adducts were determined. Among other things, we have demonstrated a two-fold stronger thermal destabilization of the double helix by a bifunctional adduct relative to a monofunctional one and a strong influence of initial state of cisplatin in incubation medium on the kinetics of DNA thermal stability under incubation with cisplatin.

DNA-complexes with platinum compounds – optical melting studies – kinetics of DNA platination

Հակաուռուցքային դեղանյութ հանդիսացող ցիսպլատինը կապվում է ԴՆԹ-ի հետ՝ առաջացնելով միջանկյալ մոնոֆունկցիոնալ և վերջնական բիֆունկցիոնալ ադուկտներ, որոնք բերում են երկպարույրի կառուցվածքային խախտմանը: ԴՆԹ-ի ջերմային հատկությունների վրա այդպիսի խախտումների ազդեցությունն ուսումնասիրելու նպատակով, դիտարկել ենք ($T_m(t)$ ֆուկցիան, որը ԴՆԹ-ի հալման ջերմաստիճանի փոփոխության կախվածությունն է ցիսպլատինի հետ ինկուբացիայի ժամանակից: Օգտագործվել է ցիսպլատին/նուկլեոտիդ մոլյար հարաբերությունը 0,01-ից 0.1, ինկուբացիան կատարվել է 0.01 M $NaClO_4$-ում: Հալման փորձերը կատարվել են հիմնային պայմաններում, որը մեծացնում է ցիսպլատինի ազդեցությունը ԴՆԹ-ի ջերմակայունության վրա, ինչպես նաև խոչընդոտում է մոնոֆունկցիոնալ ադուկտների հետագա վերափոխմանը, ինչը տեղի է ունենում չեզոք միջավայրում տաքացման հետևանքով: Աշխատանքում կատարվել է փորձնական կորերի մաթեմատիկական մշակում, ադուկտների առաջացման մոդելավորում և ($T_m(t)$ կախվածության ուսումնասիրություն: Հայտնաբերվել է, որ t<8 րոպե դեպքում ($T_m(t)$-ի վրա ազդում են միայն մոնոֆունկցիոնալ ադուկտները, որոնք առաջացել են սկզբնական մոնոհիդրատ ցիսպլատինից: t=8 րոպե դեպքում մոնոֆունկցիոնալ ադուկտների կոնցենտրացիան ամենամեծն է և նրանց ազդեցությունը ջերմակայունության վրա առավելագույնն է: 8 ր<t<10 ժ ընթացքում ($T_m(t)$-ի փոփոխությունը հիմնականում պայմանավորված է բիֆունկցիոնալ ադուկտների կուտակմամբ, թեև որոշակի ազդեցություն ունեն նաև միջանկյալ մոնոֆունկցիոնալ ադուկտները, որոնք առաջանում են սկզբնական չդիսոցված ցիսպլատինից: t>10 ժ դեպքում ($T_m(t)$-ի վրա ազդում են միայն բիֆունկցիոնալ ադուկտները: Որոշվել են պարամետրեր,
բնութագրող կինետիկան և ջերմակայունությունը ինչպես միջանկյալ մոնո ֆունկցիոնալ, այն-

պես էլ վերջնական բիֆունկցիոնալ ադուկտների համար:

Մասնավորապես ցույց է տրված, որ բիֆունկցիոնալ ադուկտի դեպքում ԴՆԹ-ի ջերմակայունությունը 2 անգամ ուժեղ է նվազում, ի տարբերություն մոնոֆունկցիոնալ ադուկտի, ինչպես նաև հաստատված է՝ ինկուբացիոն միջավայրում ցիսպլատինի սկզբնական վիճակի ուժեղ ազդեցությունը ԴՆԹ-ի ջերմակայունության կինետիկայի վրա:

ԴՆԹ կոմպլեքսներ պլատինային միացությունների հետ – ԴՆԹ-ի հալման սպեկտրալ ուսումնասիրություն – ԴՆԹ-ի պլատինացման կինետիկա

Противоопухолевый препарат цисплатин связывается с ДНК, образуя промежуточные монофункциональные и конечные бифункциональные аддукты, которые приводят к сильным структурным искажениям двойной спирали. Для изучения влияния таких искажений на термостабильность ДНК мы исследовали функцию $\delta T_m(t)$, являющуюся зависимостью изменения температуры плавления ДНК от времени инкубации с цисплатином. Использовалось молярное соотношение цисплатин/нуклеотид от 0.01 до 0.1, инкубацию проводили в 0.01 M $NaClO_4$. Эксперименты по плавлению проводили в щелочной среде, усиливающей эффект цисплатина на термостабильность ДНК и препятствующей дальнейшей трансформации промежуточных монофункциональных аддуктов, которая происходит при нагревании в нейтральной среде. Была проведена математическая обработка экспериментальных кривых $\delta T_m(t)$, моделирование образования аддуктов и соответствующего изменения термостабильности ДНК. Обнаружено, что при t<8 мин на термостабильность ДНК влияют только монофункциональные аддукты, образующиеся из исходно моногидратированного цисплатина. При t=8 мин концентрация монофункциональных аддуктов и их воздействие на термостабильность ДНК максимальны. В течение временного периода 8 мин<t<10 ч изменение $\delta T_m(t)$ в основном вызвано накоплением бифункциональных аддуктов, хотя промежуточные монофункциональные аддукты, которые образуются из первоначально недиссоциированного цисплатина, также оказывают некоторое влияние. При t>10 ч только бифункциональные аддукты оказывают влияние на $\delta T_m(t)$. Были определены кинетические параметры и изменение термостабильности, обусловленное как промежуточными монофункциональными, так и конечными бифункциональными аддуктами. В частности, показано, что бифункциональный аддукт в два раза сильнее снижает термостабильность двойной спирали по сравнению с монофункциональным аддуктом, а также продемонстрировано сильное влияние исходного состояния цисплатина в инкубационной среде на кинетику термостабильности ДНК.

Комплексы ДНК с соединениями платины – спектральное исследование плавления ДНК – кинетика платинирования ДНК

Cisplatin (cis-$Pt(NH_3)_2Cl_2$) is an effective antitumor drug that exerts its biological activity by direct strong coordination binding to DNA. It is used for treatment of testicular, ovarian, cervical, head, neck, esophageal, and lung cancer. Therefore various studies have been carried out to reveal its action mechanism [4, 9]. Cisplatin includes two cis-amine non-leaving ligands and two labile chloride leaving groups. The major product of DNA-cisplatin reaction is intra-strand cross-links between adjacent purines [4, 9]. Their formation is slow and hindered by chloride ions. Therefore DNA platination in vitro is usually carried out in $NaClO_4$. The ion ClO_4- does not stop platination in contrast to Cl^-. The half time ($t_{1/2}$) of the first chloride dissociation and substitution with a water molecule is ~2 hours [1]. The hydrolysis is followed by quick formation in DNA of intermediate monofunctional adduct mainly with N7 atom of guanine. The monofunctional adduct undergoes a slow chloride dissociation and hydrolysis characterized with approximately the same $t_{1/2}$ [1]. After that, the second coordination bond with N7 atom of a neighboring purine of the same strand arises quickly. These intra-strand cross-links account for 90% of products. Additionally, 6% of platinated sites form interstrand cross-links between neighboring guanines of different strands. Thus, almost all final adducts are bifunctional.

As we have previously found, alkaline medium (pH~10.5) strengthens a change in DNA melting temperature (δTm) caused by cisplatin binding [7]. Moreover, intermediate monofunctional adducts formed by cisplatin become stable against heating and can be studied in melting experiments [7].

These findings allowed us to measure kinetics of the shift in melting temperature under platination, i.e., to determine the dependence $\delta T_m(t)$. The formation of intermediate monofunctional and final bifunctional adducts of platination are well resolved in the plot $\delta T_m(t)$ if melting experiments are carried out in alkaline medium. It allows separate measurement of the rate of their formation and their influence on DNA thermal stability. Such measurements, their processing and modeling have been carried out in this study to determine kinetic and thermal parameters of platination.

Materials and methods. Ultra pure calf thymus DNA that we prepared was used (protein<0.1%, RNA<0.1%, molecular mass ~30 MDa). The properties of this DNA have been previously described (6). DNA at a concentration of 1.2 mg/ml was incubated with cisplatin of Sigma-Aldrich Chemical Company. For measurements of melting temperature kinetics under platination, Pt/nucleotide molar ratio (r) was 0.01 to 0.1.

Cisplatin was added to DNA from a stock solution in distilled water (1 mg/ml) after several day of incubation at 25^0C. This stock solution contains 35 % of undissociated, 65 % of monoaquated and less 1% of diaquated cisplatin [10]. The equilibrium is reached during 25 hours after cisplatin's dissolution [2, 10].

The DNA-cisplatin mixture was incubated in 0,01 M $NaClO_4$ at 37^0C in the dark (pH~6). At time intervals from 1 min to 48 h, aliquots of the reaction mixture were withdrawn. Platination in the aliquots was stopped by adjusting NaCl concentration to 0,1 M. This chloride concentration stops cisplatin binding and transformation of intermediate monofunctional adducts at temperature lower 37^0C, but there is a well pronounced further development of this reaction if the temperature is higher 50^0C (not shown). Then the samples of DNA solution were diluted to concentration 0,075 mg/ml and frozen at -28^0C [3, 7, 8, 11].

For melting experiments, DNA was thawed and diluted to 0.04 mg/ml. The melting was carried out in 0.1 M NaCl, 0.005 M Na_2CO_3, 0.001M $NaClO_4$, 5.10^{-5}M EDTA, pH 10,5. In this buffer, the melting temperature of unmodified DNA is 65±0,3^0C. DNA helix-coil transition was registered by measuring the optical density at 260 nm as a function of temperature using a SF-26 spectrophotometer (LOMO, Russia) or Perkin-Elmer Lambda 800 UV/VIS (USA).

The results of the time dependences obtained under incubation and further melting of platinated DNA were exhibited as a relative change in melting temperature $\theta(t)= \delta T_m(t)/\delta T_{max}$ where $\delta T_m(t)$ is the time dependence of a change in melting temperature, i.e., $\delta T_m(t)=T_m(t)-T_m(t=0)$, and $\delta T_{max}=\delta T_m(t\geq 10\text{ h})$ is the maximal shift in melting temperature that is reached during 10 hours of incubation. The dependences θ(t) are almost the same for the Pt/nucleotide molar ratio r from interval 0,01 to 0,1. For these r values, almost all cisplatin binds to DNA during incubation [5].

In all calculations, the fractions of primary products (monoaquated and non-dissociated cisplatin), intermediate monofunctional and final bifunctional adducts are given in regard to total cisplatin in incubation medium.

Results and Discussion. *The kinetics of DNA thermal stability under platination*

In our previous study [7], we have found that alkaline medium (pH~10.5) makes the shift in the melting temperature caused by cisplatin (δT_m) much stronger relative to melting carried out at pH~7. Additionally, intermediate monofunctional adducts become stable against heating in alkaline conditions. Therefore the properties of both monofunctional and bifunctional adducts can be studied in melting experiments if registration of melting curves is carried out at pH~10.5 after various time intervals of DNA incubation with cisplatin in 0,01 M $NaClO_4$ at pH 6. A monotonous decrease of melting temperature with time ($T_m(t)$ occurs from the first minutes of incubation of DNA with cisplatin, and the maximal destabilization shift (δT_{max}) is reached during 10 hours. Later $T_m(t)$ and $\delta T_m(t)=T_m(t)-T_m(t=0)$ do

not change. The maximal destabilization corresponds to the shift δT_{max}= -12±1,5^{0}C for Pt/nucleotide molar ratio r=0,05.

In our present study, the shift $\delta T_m(t)$ is normalized to $\delta T_{max}=\delta T_m(t \geq 10$ h). For this relative shift in melting temperature $\theta(t)= \delta T_m(t)/\delta T_{max}$, all kinetic curves $\theta(t)$ are very close if $r \leq 0.1$. All dependences $\theta(t)$ are monotonous and change with time from zero to unity.

In fig. 1, the time dependence $\theta(t)= \delta T_m(t)/\delta T_{max}$ for r=0.05 is exhibited (curve 1 exp). The parameter $t_{1/2}$ determined as $\theta(t_{1/2})$=0.5 is equal to 70 min. A two-step change in $\theta(t)$ is well seen. To carry out separation of slow and quick steps, the curve 1 exp was differentiated and dissolved into the two constituents. Then the constituents of the differential curve were separately integrated to obtain corresponding constituents 1a and 1b of curve 1 exp (fig. 1). Constituent 1a is characterized with $t_{1/2a}$=1.2 min and its height is equal to 0.29. For constituent 1b, the value of $t_{1/2b}$ is 120 min and the height is 0.71.

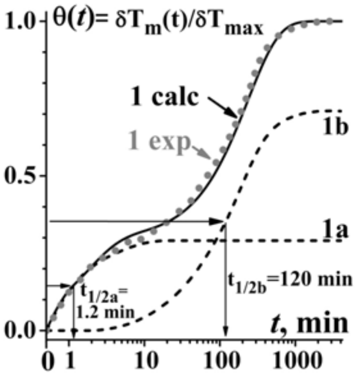


Fig. 1. The time dependence of a relative change in DNA melting temperature caused by binding and transformation of cisplatin: $\theta(t)=\delta T_m(t)/\delta T_{max}$; $\delta T_m(t)=T_m(t)-T_m(t=0)$; $\delta T_{max}=T_m(t \geq 10$ h$)-T_m(t=0)$ is the maximal shift in melting temperature reached at $t>10$ h. The experimental curve (**1 exp**) and the curve calculated using Eqs.(3)-(14) (**1 cal**) are in good agreement. The curves **1a** and **1b** are the constituents of the experimental curve $\theta(t)$ (**1 exp**). At t<8 min, constituent **1a** reflects a relative change in melting temperature caused the formation and accumulation of monofunctional adducts formed from monoaquated cisplatin. The growth of $\theta(t)$ above constituent **1a** at t>8 min is depicted with constituent **1b** that mainly reflects accumulation of bifunctional adducts.

<u>Binding to DNA and further transformation of cisplatin.</u> In this study, the relative concentration (fraction) of initial monoaquated (*ma*) and non-dissociated (*c*) cisplatin, intermediate monofunctional (*m*) and final bifunctional adducts (b) are given in regard to the total concentration of cisplatin in incubation medium.

In cisplatin stock solution we use (concentration 1 mg/ml and pH 5, 6), the fraction of monoaquated cisplatin (θ_{ma}) is equal to 0,65 and the fraction of unaquated (non-dissociated) cisplatin (θ_c) is 0,35 (10). The value of $t_{1/2}$mma for formation of monofunctional adducts from monoaquated cisplatin evaluated in various studies is 1÷6 minutes ((1) and references therein). There are no other types of adducts that can influence DNA thermal stability during the first minutes of incubation, because parallel formation of monofunctional adducts from initially unaquated (non-dissociated) cisplatin (θc=0.35) is too slow ($t_{1/2}$mc~2h). Although inter-strand and intra-strand cross-links can be quickly formed from diaquated cisplatin, its fraction in the cisplatin stock solution is less 0.01 (10). Therefore these DNA modifications do not influence δTm(t) and θ(t) if t is low. Thus, the first step of the kinetic curve 1 exp in fig. 1 is caused by quick formation of monofunctional adducts from monoaquated cisplatin (*ma*) that arises in stock solution of

cisplatin. Corresponding constituent 1a reflects a relative change in melting temperature caused by the accumulation of monofunctional adducts formed from monoaquated cisplatin from stock solution (*mma*). This process overlaps the time interval $0<t<8$ min and $t_{1/2mma}$=1,2 min. At t>8 min, constituent 1a does not change. Additional increase in $\theta(t)$ above constituent 1a is exhibited by constituent 1b caused by all other types of adducts. This second step of curve 1 exp in fig. 1 corresponds to the two slow processes: transformation monofunctional adducts into final bifunctional ones and formation of monofunctional adducts (*mc*) from unaquated (non-dissociated) cisplatin (*c*) that accounts for 35 % in stock solution ($\theta_c(0)$=0,35).

Modeling of the time dependences of thermal stability and of the fractions of monofunctional and bifunctional adducts. As it was done before (1), let us consider cisplatin transformation as parallel successive pseudo-first-order reactions. Initially monoaquated cisplatin (ma) undergoes the following transformation during incubation with DNA:

monoaquated cisplatin (**ma**) → *monoadduct* (**mma**) → *biadduct* (**bma**) (1)

Initially undissociated cisplatin (c) transforms in the following way:

$$\textit{cisplatin}\ (\mathbf{c}) \xrightarrow{k_{mc}} \textit{monoadduct}\ (\mathbf{mc}) \xrightarrow{k_b} \textit{biadduct}\ (\mathbf{bc}) \qquad (2)$$

The first stage in Eq.(1) is quick (1÷6 min) and the second one is slow (~2 h) (1). In Equations (2), both stages are slow (~2 h). Equations (1)-(2) are simplified by omission of short-lived intermediates of very low relative concentration. Those are monoaquated cisplatin originated from non-dissociated cisplatin (Equations (2)) and aquated monofunctional adducts (Equations (1), (2)).

The time dependences of the fractions of all compounds involved in reactions given with Equations (1), (2) are the following:

$$\theta_c(t)= \theta_c(0)\cdot \exp(-k_{mma}\cdot t) \qquad (3)$$

$$\theta_{ma}(t)=\theta_{ma}(0)\cdot \exp(-k_{mc}\cdot t) \qquad (4)$$

$$\theta_{mc}(t)=\theta_c(0)\cdot \frac{k_{mc}}{k_{mc}+k_b}\cdot [\exp(-t\cdot k_{mc}) - \exp(-t\cdot k_b)] \qquad (5)$$

$$\theta_{mma}(\mathrm{t})=\theta_{ma}(0)\cdot \frac{k_{mma}}{k_{mma}+k_b}\cdot [\exp(-t\cdot k_{mma}) - \exp(-t\cdot k_b)] \qquad (6)$$

$$\theta_{bc}(\mathrm{t})=\theta_c(0)\cdot [1-\frac{k_b}{k_b-k_{mc}}\cdot \exp(-t\cdot k_{mc})+\frac{k_{cm}}{k_b-k_{mc}}\cdot \exp(-t\cdot k_b)] \qquad (7)$$

$$\theta_{bma}(\mathrm{t})=\theta_{ma}(0)\cdot [1-\frac{k_b}{k_b-k_{mma}}\cdot \exp(-t\cdot k_{mma})+\frac{k_{mma}}{k_b-k_{mc}}\cdot \exp(-t\cdot k_b)] \qquad (8)$$

In conditions of the cisplatin stock solution (1 mg/ml, pH 5.6), the sum of primary total fraction of non-dissociated $\theta_c(0)$ and monoaquated $\theta_{ma}(0)$ cisplatin is equal to unity:

$$\theta_c(0)+\theta_{ma}(0)=1 \qquad (9)$$

The fraction of total unbound cisplatin ($\theta_{cis_tot}(t)$) is the sum of monoaquated and non-dissociated cisplatin:

$$\theta_{cis_tot}(t)=\theta_{ma}(t)+\theta_c(t) \qquad (10)$$

The total fractions of monofunctional and bifunctional adducts are the following:

$$\theta_m(t)=\theta_{mc}(t)+\theta_{mma}(t) \qquad (11)$$

$$\theta_b(t)=\theta_{bc}(t)+\theta_{bma}(t) \qquad (12)$$

The time dependences of all fractions were calculated for parallel successive pseudo-first-order reactions (Equations (1) and (2)) with primary conditions $\theta_c(0)=0.35$, $\theta_{ma}(0)=0.65$ where $\theta_c(t)$ and $\theta_{ma}(t)$ are the fractions of non-dissociated and monoaquated cisplatin, respectively (10). We also use the values of the pseudo-first-order rate constants $k_{mc}=10{,}2\cdot10^{-5}$ and $k_b=9{,}2\cdot10^{-5}\ s^{-1}$ for formation of monofunctional adducts from non-dissociated cisplatin and bifunctional adducts from monofunctional adducts determined by Bancroft et al. (1). Fig.1 demonstrates that, in 0.01 M $NaClO_4$, $t_{1/2mma}=1.2$ min for formation of monofunctional adducts from monoaquated cisplatin. It corresponds to pseudo-first-order rate constant $k_{mma}=9.7\cdot10^{-3}s^{-1}$. Using these parameters, we have calculated time dependences of fractions of two types of monofunctional ($\theta_{mc}(t)$, $\theta_{mma}(t)$) and bifunctional ($\theta_{bc}(t)$, $\theta_{bma}(t)$) adducts arisen from non-dissociated (c) and monoaquated (ma) cisplatin, respectively.

If all cisplatin in stock solution is monoaquated ($\theta_c(0)=0$, $\theta_{ma}(0)=1$), the height of the first step of curve 1 exp and the constituent 1a in fig. 1 would be maximal, i.e., $\delta T_{max\ m}/\delta T_{max}=0{,}45$ (0,29/0,65=0,45), where δT_{max} m is a temperature shift caused by transformation of all cisplatin introduced in DNA solution into monofunctional adducts only.

At a studied cisplatin/nucleotide molar ratio (r=0.01-0.1), final cisplatin-DNA products are the same independently of cisplatin species in stock solution (1). These final products formed after 10 hours are mainly bifunctional ones (intra-strand and inter-strand cross-links account for 96 %) and their total per nucleotide amount is close to r. Therefore the final and maximal shift of melting temperature is almost fully caused by bifunctional adducts, i.e., $\delta T_{max\ b}=\delta T_{max}$, where δT_{max} is the maximal (final) shift in melting temperature, and $\delta T_{max\ b}$ is the contribution of bifunctional adducts in this final shift. Thus, $\delta T_{max\ b}/\delta T_{max}$ is equal to unity and $\delta T_{max\ m}/\delta T_{max}=0{,}45$ where $\delta T_{max\ m}$ is a temperature shift caused by transformation of all cisplatin introduced in DNA solution into monofunctional adducts only. It means that destabilizing effect of bifunctional adducts is 2,2-fold stronger than that of monofunctional ones (1/0,45). Taking into account these circumstances, the time dependence of a relative change in melting temperature can be represented in the following way:

$$\theta(t)=\delta T_m(t)/\delta T_{max}=(\delta T_{max\ m}/\delta T_{max}).\theta_m(t)+(\delta T_{max\ b}/\delta T_{max}).\theta_b(t) \qquad (13)$$

$$\theta(t)=0{,}45\cdot\theta_m(t)+\theta_b(t) \qquad (14)$$

<u>Kinetics of cisplatin transformation and its influence on temporal behavior of DNA thermal stability under platination.</u> As follows from fig. 2A, the fractions of free monoaquated (θ_{ma}) and non-dissociated (θ_c) cisplatin decrease to zero during 8 min and 10 hours, respectively. Those time intervals correspond to the time of saturation for constituents 1a and 1b in fig. 1. During the first 8 min of incubation, only monofunctional adducts arisen from monoaquated cisplatin of stock solution are formed. Their maximal fraction

($\theta_{mma}(t=8\ \text{min})=0{,}65$) is close to the initial fraction of monoaquated cisplatin in

stock solution ($\theta_{ma}(t=0)$, fig. 2A) and to the maximal total fraction of the monofunctional adducts θ_m(t=8 min) (fig. 2B):

$$\theta_{ma}(t=0) \approx \theta_{mma}(t=8 \text{ min}) \approx \theta_m(t=8 \text{ min}) \approx 0.65 \qquad (15)$$

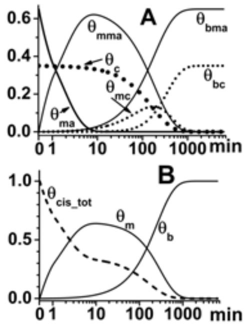


Fig. 2. A) Calculated time dependences of fractions of undissociated ($\theta_c(t)$) and monoaquated ($\theta_{ma}(t)$) cisplatin; θ_{mc}, θ_{mma}, θ_{bc}, θ_{bma} are the fractions of monofunctional (**m**) and bifunctional (**b**) adducts arisen from undissociated cisplatin (c) and monoaquated cisplatin (**ma**). B) Calculated time dependences of the total fractions of monofunctional ($\theta_m=\theta_{mc}+\theta_{mma}$), bifunctional ($\theta_b=\theta_{bc} + \theta_{bma}$) adducts, and the total fraction of unbound cisplatin ($\theta_{cis_tot}=\theta_c+\theta_{ma}$). The following parameter values were used for calculation: $\theta_c(0)=0.35$, $\theta_{ma}(0)=0.65$, $k_{mma}=9.7\cdot10\text{-}3$ s-1, $k_{mc}=10.2\cdot10^{-5}$ s-1 (1) and kb=$9.2\cdot10^{-5}$ s^{-1} (1).

Monofunctional adducts arisen from non-dissociated cisplatin cannot be accumulated, since the rates of their formation from non-dissociated cisplatin and transformation into bifunctional adducts are almost equal, and the maximal value of their fraction is much lower ($\theta_{mc}(t=3\text{h})=0{,}13$, fig. 2A).

An increase in the fractions of bifunctional adducts arisen from monoaquated and non-dissociated cisplatin are characterized with S-shaped curves and half times about 2 and 6 hours, respectively (fig. 2A). For total fraction of bifunctional adducts ($\theta_{bma}+\theta_{bc}$), the half time is 3 hours (fig. 2B).

The time dependence of the relative thermal stability $\theta(t)=\delta Tm(t)/\delta T_{max}$ was calculated for parallel successive pseudo-first-order reactions (Equations (1) and (2)) with primary conditions $\theta_c(0)=0{,}35$, $\theta_{ma}(0)=0{,}65$ using Equations (13), (14). There is a good coincidence between calculated (1 calc) and experimental (1 exp) curves θ(t) (fig. 1). Both curves demonstrate a two-step shape. A decrease in the fraction of total cisplatin also demonstrates a similar two-step character (fig. 2B).

Besides experimental primary conditions ($\theta_c(0)=0{,}35$, $\theta_{ma}(0)=0{,}65$), additional modeling for two limiting cases was carried out, firstly, for cisplatin fully non-dissociated in stock solution ($\theta_c(0)=1$, $\theta_{ma}(0)=0$) and, secondly, for fully monoaquated cisplatin ($\theta_c(0)=0$, $\theta_{ma}(0)=1$). All three dependences $\theta(t)$ are shown in fig. 3. It is seen that the state of cisplatin in stock solution strongly influences temporal behavior of DNA stability. If all cisplatin in stock solution is monoaquated ($\theta_{ma}(0)=1$), then the first step is markedly higher relative to the present experiment, in which $\theta_{ma}(0)=0{,}65$. If cisplatin is fully non-dissociated ($\theta_{ma}(0)=0$), the "quick" first step disappears and the shape of the curve is mainly determined by accumulation of bifunctional adducts.

Computer modeling of a change in $\theta(t)= \delta T_m(t)/\delta T_{max}$ without thermal impact of monofunctional adducts formed from non-dissociated cisplatin demonstrates their weak influence on $\theta(t)$ (fig. 3). It means that the second step in the curve $\theta(t)= \delta T_m(t)/\delta T_{max}$ mainly reflects accumulation of final bifunctional adducts.

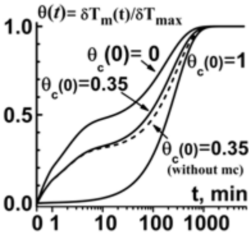


Fig. 3. Calculated time dependences of a relative change in melting temperature at various starting conditions: $\theta_c(0)=0$, $\theta_{ma}(0)=1$; $\theta_c(0)=1$, $\theta_{ma}(0)=0$; $\theta_c(0)=0.35$, $\theta_{ma}(0)=0.65$ (curve **1 calc** from fig. 1); and the same dependence calculated without thermal impact of monofunctional adducts formed from undissociated cisplatin. The values of $\theta_c(0)$ are shown for curve identification.

The first step of $\theta(t)$ that corresponds to accumulation of monofunctional adducts from monoaquated cisplatin is well resolved because $t_{1/2a}=t_{1/2mma}=1{,}2$ min is a hundred times lower than the time of transformation of monofunctional adducts into bifunctional ones ($t_{1/2b}\approx t_{1/2mb}\approx$ 2h) and the time of formation of monofunctional adducts from non-dissociated cisplatin ($t_{1/2mc}$~2h). Therefore monofunctional adducts arisen from monoaquated cisplatin can be accumulated before their further transformation and give a resolved step.

Monofunctional adducts arisen from non-dissociated cisplatin cannot be accumulated before their further transformation and give a resolved step, since the rates of their formation from non-dissociated cisplatin and transformation into bifunctional adducts are almost equal. The maximal contribution of monofunctional adducts from non-dissociated cisplatin in $\theta(t)$ is only 0.06 (fig. 3) and the maximal value of their fraction $\theta_{mc}(t=3\text{h})=0{,}13$, i.e., both the impact and fraction of monofunctional adducts originated from monoaquated cisplatin is five times higher: their maximal contribution in $\theta(t)$ is 0.29 (fig. 1, curve 1a) and $\theta_{mma}(t=8$ min) is close to 0,65 (fig. 2A).

Thus the results of modeling demonstrate that, during the time interval $0<t<8$ min, only monofunctional adducts arisen from monoaquated cisplatin from stock solution determine the shift in melting temperature $\delta T_m(t)$. The maximal fraction of monofunctional adducts and their maximal impact on DNA melting temperature occur at $t=8$ min. That maximal fraction is equal to the initial fraction of monoaquated cisplatin in incubation medium (and in stock cisplatin solution). At $t>10$ hours, only bifunctional adducts determine the value of thermal stability and their fraction is close to unity. The separate determination and comparison of the impacts of monofunctional adducts at $t=8$ min and bifunctional adducts at $t>10$ h, and further calculation of the per adduct thermal effect demonstrate a two-fold stronger thermal destabilization of the double helix by a bifunctional adduct relative to a monofunctional one.

A kinetic curve of a change in DNA thermal stability under incubation with cisplatin is characterized with a two-step shape. The first "quick" step is caused by formation and accumulation of monofunctional adducts arisen from monoaquated cisplatin from stock solution. The second step is caused by all other processes that are much slower, but it predominately reflects the accumulation of bifunctional adducts, although there is some influence of intermediate monofunctional adducts arisen from initially non-dissociated cisplatin. The state of cisplatin in stock solution strongly influences the shape of the kinetic curve of a change DNA in thermal stability. If all cisplatin is initially monoaquated, then the first step is the highest. If cisplatin is fully non-dissociated, the "quick" first step is absent and a change in thermal stability mainly reflects the accumulation of bifunctional adducts.

In this case, the fraction and impact of monofunctional adducts is small, because of they cannot be accumulated in a large amount, since the rates of their formation from non-dissociated cisplatin and transformation into bifunctional adducts are almost equal.

Acknowledgements:

This work was supported by Belarusian-Armenian grant 11RB-017 and Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research X13-068.

REFERENCES

1. *Bancroft D.P., Lepre C.A. and Lippard S.J.* 195Pt NMR Kinetics and Mechanistic studies of cis- and trans-diamminedichloroplatinum (II) binding to DNA J. Am. Chem. Soc., *112*, 6860-6871, 1990.
2. *Davies M.S., Berners-Price S.J. and Hambley T.W.* Slowing of Cisplatin Aquation in the Presence of DNA but Not in the Presence of Phosphate: Improved Understanding of Sequence Selectivity and the Roles of Monoaquated and Diaquated Species in the Binding of Cisplatin to DNA. Inorg. Chem., *39*, 5603-5613, 2000.
3. *Galyuk E.N., Fridman A.S., Vorob'ev V.I., Haroutiunian S.G., Sargsyan S.A., Hauruk M.M. and Lando D.Y.* Compensation of DNA stabilization and destabilization effects caused by cisplatin is partially disturbed in alkaline medium. J. Biomol. Struct. Dyn., *25*, 407-418, 2008.
4. *Ho Y.-P., Au-Yeung S. C.F. and To K.K.W.* Platinum-Based Anticancer Agents: Innovative Design Strategies and Biological Perspectives. Med. Res. Rev., *23*, 633-655, 2003.
5. *Kleinwachter V., Rau H.* A study of DNA interaction with platinum cytostatics. Studia Biophysica, *103,*1, 5-12, 1984.
6. *Lando D.Y., Egorova V.P., Krot V.I., and Akhrem A.A.* Determination of protein contaminants in DNA preparations of high purity. Molecular Biology, *30*, 701-706, 1996. (Russian), Engl. Transl. 30, 418-421.
7. *Lando D.Y., Galyuk E.N., Chang Chun-Ling, Hu Chin-Kun*. Temporal behavior of DNA thermal stability in the presence of platinum compounds. Role of monofunctional and bifunctional adducts. Journal of Inorganic Biochemistry, *117*, 1, 164-170, 2012.
8. *Novakova O., Vrana O., Kiseleva V.I. and Brabec V.* DNA interactions of antitumor platinum(IV) complexes. Eur. J. Biochem., *228*, 616-624, 1995.
9. Wang D. and Lippard S.J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. Nat. Rev. Drug. Discov., *4*, 307-320, 2005.
10. *Yotsuyanagi T., Usami M., Noda Y. and Nagata M.* Computational consideration of cisplatin hydrolysis and acid dissociation in aqueous media: effect of total drug concentrations. International Journal of Pharmaceutics, *246*, 95-104, 2002.
11. *Zakovska A., Novakova O., Balcarova Z., Bierbach U., Farrell N. and Brabec V.* DNA interactions of antitumor trans-[PtCl2(NH3)(quinoline)]. Eur J Biochem., *254*, 547-557, 1998.

Received on 26.04.2013

Հայաստանի Գիտությունների Ազգային Ակադեմիա
Национальная Академия Наук Армении
National Academy of Sciences of Armenia
Հայաստանի Կենսաբանական Հանդես
Биологический Журнал Армении
Biological Journal of Armenia

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

Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 3(65), 2013

ՍԵՎԱՆԱ ԼՃԻ ՀԻՄՆԱԿԱՆ ՎՏԱԿՆԵՐԻ ՊԼԱՆԿՏՈՆԱՅԻՆ ՋՐԻՄՌՈՒՌՆԵՐԻ ՏԵՍԱԿԱՅԻՆ ԲԱԶՄԱԶԱՆՈՒԹՅՈՒՆՆ ՈՒ ԷԿՈԼՈԳԻԱԿԱՆ ԲՆՈՒԹԱԳԻՐԸ

Թ.Գ. ԽԱՉԻԿՅԱՆ, Լ.Ռ. ՀԱՄԲԱՐՅԱՆ, Ռ.Հ. ՀՈՎԱՆՆԻՍՅԱՆ, Ժ.Հ. ՄԿՐՏՉՅԱՆ

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

Ուսումնասիրվել են Սևանա լճի հիմնական վտակների պլանկտոնային համակեցության որակական և քանակական ցուցանիշները: Հայտնաբերվել են պլանկտոնային ջրիմուռների 124 տեսակներ, որոնցից 91-ը հանդիսացել են ջրերի օրգանական աղտոտվածության կենսաինդիկատորներ: Բոլոր վտակներում քանակական ցուցանիշներով գերակշռել են β-մեզոսապրոբ տեսակները:

Պլանկտոն – տեսակային կազմ – ինդիկատոր տեսակներ – ջրի որակ

Изучены количественные и качественные показатели планктона основных притоков оз. Севан. Выявлены 124 вида планктонных водорослей, из которых 91 является стойким биоиндикатором органического загрязнения вод. Во всех притоках по количественным показателям превалировали β-мезосапробные виды.

Планктон – видовой состав – виды – индикаторы – качество воды

The quantitative and qualitative parameters of Lake Sevan main tributaries waters plankton community were investigated. The 124 species of phytoplankton were detected, 91 out of which represented the bioindicator of water organic pollution. The β-mesosaprobe species were dominating by their quantitative results in all tributaries waters.

Plankton – variety – indicator species – water quality

Ջրային էկոհամակարգերի ուսումնասիրություններում որպես ջրերի որակի գնահատման զգայուն ինդիկատորներ օգտագործում են նաև կենսաբանական օրգանիզմները [3]: Քանի որ պլանկտոնային ջրիմուռները որպես հիդրոէկոհամակարգերի տրոֆիկ շղթաների առաջնային օղակ ընդունակ են բավականին արագ արձագանքելու միջավայրի փոփոխություններին, այդ առումով նրանց տեսակային կազմի հետազոտությունները շատ արժեքավոր են: Սակայն որպեսզի հետազոտությունների արդյունքները լինեն լիարժեք և համադրելի, ջրային էկոհամակարգերի վիճակի գնահատումը կատարվել է պլանկտոնային ջրիմուռների և որակական, և քանակական ցուցանիշների հիման վրա:

Նյութ և մեթոդ: Ուսումնասիրված գետերից Լիճքը (34,0 կմ^2 և 8 կմ), Մաքենիսը (124,0 կմ^2 և 24,6 կմ), Արգիճին (387,0 կմ^2 և 49,7 կմ), Մասրիկը (680,0 կմ^2 և 42,4 կմ), Արփան (250 մլն մ^3) և Վարդենիսը (114,6 կմ^2 և 27,5 կմ) թափվում են Մեծ Սևան, իսկ Գավառագետը (480,0 կմ^2 և 40,4 կմ) և Ձկնագետը (96,0 կմ^2 և 21,3կմ)՝ Փոքր Սևան [7]: Աշխատանքի համար նյութ են ծառայել 2010 թ. մարտից նոյեմբեր ընկած ժամանակահատվածում Սևանա լիճ թափվող ութ գետերից (Գավառագետ, Արգիճի, Լիճք, Վարդենիս, Արփա, Մաքենիս, Մասրիկ, Ձկնագետ) վերցված ամենամսյա փորձանմուշները: Փորձանմուշների նախնական և հետագա լաբորատոր մշակումները

կատարվել են ըստ ջրակենսաբանության մեջ ընդունված մեթոդների [1]: Ուսումնասիրվել է ֆիտոպլանկտոնային համակեցության որակական և քանակական կազմը: Ջրիմուռների տեսակային կազմի որոշումը կատարվել է տեսակի իդենտիֆիկացման համընդհանուր ճանաչում գտած որոշիչների և ուղեցույցների օգնությամբ [5,8,11-13]:

Արդյունքներ և քննարկում: 2010 թ. հետազոտությունների արդյունքում Սևանա լիճ թափվող հիմնական վտակներում հայտնաբերվել են ջրիմուռների 124 տեսակներ: Տեսակային բազմազանությամբ գերակշռել են դիատոմային ջրիմուռները՝ կազմելով 86 տեսակ: Կանաչ ջրիմուռները ներկայացել են 20 տեսակներով, իսկ կապտականաչ ջրիմուռները՝ 18: Ըստ տվյալների, 1990-1991 թթ. ընթացքում Սևանա լիճ թափվող Մասրիկ, Արփա, Գավառագետ և Մաքենիս գետերի ֆիտոպլանկտոնային համակեցության հետազոտության արդյունքում նս դիտարկվել էին նմանատիպ արդյունքներ [9]:

Դիատոմային ջրիմուռներ: Դիատոմային ջրիմուռները ներկայացել են 86 տեսակով, որը կազմել է ֆիտոպլանկտոնային համակեցության տեսակային բազմազանության 69%-ը: Գետերում բարձր քանակական ցուցանիշներով գերակշռել են *Fragilaria, Diatoma, Melosira, Cymbella, Ceratoneis, Navicula, Nitzschia, Cyclotella, Stephanodiscus* և *Cocconeis* ցեղերի տեսակները: Առավելագույն թվաքանակ (3 մլն. 743 000 բջ/լ) և կենսազանգված (15,6 գ/մ^3) գրանցվել է հուլիսին՝ Արփա դիտակետում: Դոմինանտել են *Melosira granulata, Melosira italica* և *Fragilaria crotonensis* տեսակները: Օգոստոսին Արփա դիտակետում դիտվել է նվազագույն թվաքանակ (3900 բջ/լ) և կենսազանգված (0,02 գմ^3):

Ըստ աշխարհագրական տարածվածության, դիատոմային ջրիմուռների հայտնաբերված տեսակների 50 %-ը հանդիսացել են հյուսիսային տեսակներ, իսկ 31 %-ը եղել են կոսմոպոլիտներ, որոնց բնորոշ է առավել գլոբալ տարածվածությունը, 7 %-ը կազմել են հյուսիս-ալպիական տեսակները [4]: Խուրսևիչի բնորոշմամբ, էվտրոֆ հիդրոէկոհամակարգերում գերակշռում են դիատոմային ջրիմուռների կոսմոպոլիտ տեսակները, մինչդեռ մեզոտրոֆ հիդրոէկոհամակարգերում գերակշռում են հյուսիսային տեսակները, ինչը բնորոշ է եղել հետազոտված գետերին [10]: Դիատոմային ջրիմուռները հանդիսանում են ջրի հանքայնացման ինդիկատորներ [4]: Դիատոմային ջրիմուռների հայտնաբերված տեսակների շուրջ 67 %-ը եղել են չեզոք, 10,3 %-ը՝ հալոֆիլներ, 7 %-ը՝ հալոֆոբներ [4]: Ըստ ջրի pH-ի նկատմամբ ռեակցիայի, դիատոմային ջրիմուռների հայտնաբերված տեսակների 61 %-ը եղել են ալկալաֆիլներ, 18 %-ը՝ չեզոք, իսկ 3,4 %-ը կազմել են ացիդոֆիլ տեսակները, որոնք գետերում արձանագրվել են բավականին ցածր քանակական ցուցանիշներով և հաճախականությամբ: Այդ տեսակներն են եղել *Pinnularia nobilis, Navicula rotaena* և *Tabellaria fenestrata*: Դիատոմային ջրիմուռների 86 տեսակներից 67-ը հանդիսացել են ջրերի օրգանական աղտոտվածության կենսաինդիկատորներ: Դրանցից 46%-ը եղել են β-մեզոսապրոբ, 21%-ը՝ o-β-մեզոսապրոբ, 9 %-ը՝ α-մեզոսապրոբ, 7 %-ը՝ o-օլիգոսապրոբ, 6 %-ը՝ β - α–մեզոսապրոբ, իսկ 11 %-ը՝ խառը տեսակներ [2, 6]: Հետազոտված գետերում բարձր թվաքանակ և կենսազանգված ցուցաբերել են β-մեզոսապրոբ տեսակների շուրջ 53 %-ը, o-β-մեզոսապրոբ տեսակների՝ 62 %-ը [աղ.1]:

Կապտականաչ ջրիմուռներ: Գետերում կապտականաչ ջրիմուռները ներկայացել են 18 տեսակներով, որը կազմել է տեսակային բազմազանության 14,5 %-ը: Ռեոպլանկտոնի մշտական ներկայացուցիչներն են եղել *Aphanothece clathrata* (2000-148000 բջ/լ, 0,003-0,3 գ/մ^3) և *Microcystis aeruginosa* (2000-28000 բջ/լ, 0,001-0,08 գ/մ^3) տեսակները: Երկուսն էլ պլանկտոնային տեսակներ են, չեզոք են pH-ի և ջրի աղայնության նկատմամբ: Կապտականաչ ջրիմուռների առավելագույն թվաքանակ (321000 բջ/լ) և կենսազանգված (0,9 գ/մ^3) դիտարկվել է հուլիսին՝ Մաքենիս գետում: Դոմինանտել է *Aphanothece clathrata* տեսակը, իսկ սուբդոմինանտ է եղել *Oscillatoria limosa* տեսակը: Նվազագույն թվաքանակ (1300 բջ/լ) և կենսազանգված (0,003 գ/մ^3) դիտվել է օգոստոսին՝ Արփա գետում: *Microcystis aeruginosa, Aphanazimenon flose-aque* (10000-30000 բջ/լ, 0,07-0,2 գ/մ^3), ինչպես նաև *Oscillatoria* (2000-70000 բջ/լ, 0,005-0,3 գ/մ^3) և *Spirulina* (13000-40000 բջ/լ, 0,03-0,1 գ/մ^3) ցեղերի որոշ տեսակներ, որոնք հայտնաբերվել են գետերում, հանդիսանում են տոքսիկ: Կապտականաչ ջրիմուռների 18 տեսակներից 14-ը եղել են ջրերի օրգանական աղտոտվածության կենսաինդիկատորներ [2, 6]: Դրանցից 42 %-ը հանդիսացել են β-մեզոսապրոբ, 21 %-ը՝ α-մեզոսապրոբ, 7 %-ը՝ o-β-մեզոսապրոբ, 7 %-ը՝ β-α-մեզոսապրոբ, իսկ մնացածը՝ խառը (աղ.1):

Կանաչ ջրիմուռներ: Հետազոտված գետերում հայտնաբերվել են կանաչ ջրիմուռների 20 տեսակ: Գերակշռել են *Ankistrodesmus* (1300-9300 բջ/լ և 0,001-0,05 գ/մ^3), *Oocystis* (1300-10000 բջ/լ և 0,007-0,04 գ/մ^3) և *Coelastrum* (9300-20000 բջ/լ և 0,04-0,09 գ/մ^3) ցեղատեսակները: Առավելագույն թվաքանակ (30000 բջ/լ) դիտարկվել է հուլիսին՝ Լիճք գետում, իսկ առավելագույն կենսազանգված (0,3 գ/մ^3)՝ Մաքենիս գետում: Առավելագույն թվաքանակը դիտվել է *Coelastrum microporum* տեսակի զարգացմամբ, իսկ առավելագույն կենսազանգվածը, որը դիտվել է 5300 բջ/լ թվաքանակի դեպքում, պայմանավորված է եղել խոշոր *Pandorina morum* գաղութային տեսակի զարգացմամբ: Կանաչ ջրիմուռների նվազագույն թվաքանակը հետազոտված շրջանում եղել է 1300 բջ/լ, իսկ նվազագույն կենսազանգվածը՝ 0,001 գ/մ^3: Հայտնաբերված կանաչ ջրիմուռները եղել են հիմնականում պլանկտոնային տեսակներ, գերակշռել են կոսմոպոլիտները, մեծ մասը չեզոք են եղել pH-ի և ջրի աղայնության նկատմամբ: Կանաչ ջրիմուռների 20 տեսակներից 10-ը հանդիսացել են ջրերի օրգանական աղտոտվածության կենսաինդիկատորներ [2,6]: Դրանց 50%-ը եղել են β-մեզոսապրոբ, 30%-ը՝ o-β-մեզոսապրոբ, 10 %-ը՝ β-α-մեզոսապրոբ, 10%-ը՝ p-α մեզոսապրոբ տեսակներ [աղ.1]:

Աղ.1. Սևանա լճի հիմնական վտակների պլանկտոնային ջրիմուռների տեսակային կազմը և էկոլոգիական բնութագիրը

	Տեսակի անվանումը	Բնակա-տեղին	Ինդիկատորային բնութագիրը	Դիտակետեր							
				1	2	3	4	5	6	7	8
	Դիատոմային ջրիմուռներ										
1	Achnanthes clevei Grun. var clevei	պլ$_1$	β		+				+		
2	Achnanthes minutissima Kutz.	պլ$_1$	o-β	+	+				+		+
3	Amphora ovalis Kutz. var. ovalis	բ	β		+			+	+	+	
4	Anomoeonis sphaerophora (Kutz.)	բ	β -α		+						
5	Asterionella formosa Hass	պլ	o-β			+		+	+	+	
6	Ceratoneis arcus Kutz.	պլ$_1$	o-β	+	+	+	+	+	+	+	+
7	Cocconeis pediculus Ehr	պլ$_1$	β	+							+
8	Cocconeis placentula Ehr.	պլ$_1$	o	+	+	+	+	+	+	+	+
9	Cyclotella comta (Ehr.) Kutz.	պլ	β	+	+			+	+		
10	Cyclotella kutzingiana Thw.	պլ	β	+	+	+	+		+		+
11	Cyclotella stelligera Cl. et Grun.	պլ	β						+		
12	Cymatepleura elliptica (Breb) W. Sm.	բ	β		+				+	+	+
13	C. solea (Breb) W. Sm.	բ	β -α	+					+	+	
14	Cymbella affinis Kutz.	պլ$_1$	β	+				+			
15	C. cistula (Hempr.) Grun.	պլ$_1$	β		+		+	+			
16	C. helvetica Kutz.	պլ$_1$	o	+				+			
17	C. lanceolata (Ehr)V.H.	պլ$_1$	β								+
18	C. prostrata (Berk.) Cl.	պլ$_1$	β	+	+	+	+	+	+	+	+
19	C. ventricosa Kutz.	պլ$_1$	o-β	+	+	+	+	+	+	+	+
20	Diatoma elongatum Ag.	պլ	o-β							+	
21	D. hiemale (Lyngb.)Heib.	պլ$_1$	x	+	+	+	+	+	+	+	+
22	D. vulgare Bory var. vulgare	պլ$_1$	β	+	+	+	+	+	+	+	+
23	Didymosphenia geminata (Lyngb.) M. Schmidt	պլ$_1$	x		+		+				
24	Epithemia zebra(Ehr.) Kutz.	պլ$_1$	β								+
25	Fragilaria capucina Desm.	պլ	o-β	+	+	+	+	+	+	+	+
26	F. construens (Ehr.) Grun	պլ$_1$	β	+	+	+	+	+	+	+	+
27	F. crotonensis Kitt.	պլ	o-β	+	+	+	+	+	+	+	+
28	Gomphonema acuminatum Ehr. var. acuminatum	պլ$_1$	β						+	+	
29	G. angustatum Grun	պլ$_1$	β	+			+	+	+	+	+
30	G. olivaceum (Lyngb.) Kutz.	պլ$_1$	β						+	+	
31	Gyrosigma acuminatum Rbh.		o-β							+	
32	Hantzschia amphioxys (Ehr.) Grun.	բ	α		+						
33	Melosira granulata (Ehr.) Ralfs.	պլ	β		+	+					
34	M. islandica O. Mull	պլ	β		+	+		+	+		
35	M. italica Ehr. Kutz	պլ	β					+	+		
36	M. varians Ag.	պլ	β	+	+	+	+	+	+	+	+
37	Meridion circulare (Grev.)Ag.	պլ$_1$	x-o	+	+	+	+	+	+	+	+
38	Navicula bacilloformis Grun	բ	էվրիսապրոբ					+	+		+

39	N. cryptocephala Kutz.	բ	α	+						+	+
40	N. dicephala (Ehr.) W.Sm.	բ	o-β	+			+		+		
41	N. lanceolata (Ag.) Kutz.	բ	էվրիսապրոբ		+		+				
42	N. menisculus Schum. var menisculus	բ	β -α	+			+		+		+
43	N. pupula Kutz. var pupula	բ	β	+			+	+	+	+	
44	N. radiosa Kutz.	բ	β			+				+	
45	N. rhynchocephala Kutz.	բ	α	+						+	+
46	Nitszchia angustata Kutz.		α	+					+	+	
47	N. amphibia Grun. Nitszchia kutzingiana Hilse		β -α				+				
48	N. linearis W.Sm. var linearis	բ	o-β								
49	N. dissipata (Kutz.) Grun.		o-β	+	+	+			+		
50	N. kutzingiana Hilse	պ	էվրիսապրոբ		+		+	+	+		
51	N. palea(Kutz.) W. Sm.var palea	բ	α		+				+		
52	N. microcephala Grun.		β	+		+			+		
53	N. fonticola Grun.		o-β		+					+	+
54	Pinnularia major Kutz.	բ	β	+			+	+			
55	P. microstauron (Ehr.) Cl.	բ	o	+							+
56	P. mesolepta	բ	o	+	+				+		
57	P. nobilis Ehr.	բ	o				+		+		
58	Rhoicosphenia curvata (Kutz.) Grun.	պ1	β	+	+	+	+	+	+	+	+
59	Stauroneis anceps Ehr.	բ	β	+	+	+	+	+	+	+	+
60	Stephanodiscus astraea (Ehr.)Grun.	պ	o-β	+		+	+		+	+	
61	S. hantzchii Grun..	պ	α	+	+	+		+	+	+	+
62	Surirella ovata Kutz.	բ	β	+					+	+	
63	S. robusta Ehr.var. splendid (Ehr.) V.H.	բ	β	+					+	+	
64	S. angustata	բ	β		+						
65	Synedra acus Kutz	պ	β							+	
66	S. ulna(Nitzsch.)Ehr.	պ1	β	+	+	+	+	+	+	+	+
67	Tabellaria fenestrata (Lyngb) Kutz.	պ	o-β	+				+	+	+	+
Կապտականաչ ջրիմուռներ											
1	Aphanizomenon flose-aqua Ralfs.	պ	β						+		+
2	Aphanothece clathrata Wet. G.S. West	պ	β	+	+	+	+	+	+	+	+
3	A. stagnina B.-Peters, et eitl	պ	x-o		+				+		+
4	Microcystis aeruginosa (Kutz.) Elenk.	պ	β	+	+	+	+	+	+	+	+
5	Oscillatoria limosa Ag.	պ	β -α					+	+	+	
6	Os. limnetica Lemm.	պ	β						+	+	
7	Os.formosa Bory	պ	α	+	+				+		
8	Os.brevis (Kutz.)Gom.	պ	α	+							
9	Os.geminata Meneghini	պ	β	+	+						
10	Os. putrida Schmidle	պ	p						+	+	
11	Phormidium foveolarum Gom.	պ	α		+			+	+		
12	P.inundatum Kütz	պ	o						+		+
13	P.papyraceum Kutz.	պ	o-β						+		
14	S.platensis Gom.	պ	β								+
Կանաչ ջրիմուռներ											
1	Ankistrodesmus falcatus (Ralfs)	պ	β -α	+	+					+	+
2	Botryococcus braunii Kutz.	պ	o-β			+		+			
3	Clorella vulgaris Beijer.	պ	p-α	+	+						+
4	Closterium monilifirum Ehr.	պ	β		+					+	+
5	Coelastrum microporum Nageli	պ	β	+			+			+	
6	Oocystis borgei Snow	պ	o-β				+				
7	O. lacustris Chodat	պ	o-β			+	+		+	+	
8	Pandorina morum O.F.Müller	պ	β		+						
9	Scenedesmus obliquus (Turp.) Kutz.	պ	β						+		
10	S. quadricuada(Turp.) Breb.	պ	β								+

Պ-պլանկտոն, բ-բենթոս, պ1-պերիֆիտոն, β-բետտա-մեզոսապրոբ, α-ալֆա-մեզոսապրոբ, o-օլիգոսապրոբ, o-β-օլիգո-բետտա-մեզոսապրոբ, p-α-պոլի-ալֆա-մեզոսապրոբ, x-քսենոսապրոբ, x-o-քսենոօլիգոմեզոսա-պրոբ: Դիտակետեր՝ 1-Մասրիկ, 2-Մաքենիս, 3-Արփա, 4-Վարդենիս, 5-Արգիճի, 6-Լիճք, 7-Գավառագետ, 8- Ձկնագետ

2010 թ. Սևանա լճի հիմնական վտակներում ֆիտոպլանկտոնային համակեցության հետազոտությունների վերլուծության արդյունքում պարզվել է, որ գետերում տեսակային բազմազանությամբ, ինչպես նաև քանակական ցուցանիշներով

(4000-3743000 բջ/լ և 0,02-15,6 գ/մ^3), գերակայել են դիատոմային ջրիմուռները: Կանաչ ջրիմուռները հանդիսացել են սուբդոմինանտ՝ ըստ տեսակային բազմազանության, իսկ կապտականաչ ջրիմուռները՝ ըստ քանակական ցուցանիշների: Ըստ ֆիտոպլանկտոնային ջրիմուռների տեսակային բազմազանության, գետերը կարելի է ներկայացնել հետևյալ կերպ.

Լիճք-Մասրիկ-Գավառագետ-Մաքենիս-Ձկնագետ-Արգիչի-Վարդենիս-Արփա

Ըստ պլանկտոնային համակեցության, տարեկան միջին թվաքանակի և կենսազանգվածի ցուցանիշների, գետերը դասակարգվել են հետևյալ կերպ՝ Արփա-Լիճք-Արգիճի-Մասրիկ-Վարդենիս-Մակենիս-Ձկնագետ-Գավառագետ (ըստ թվաքանակի), Արփա-Արգիճի-Լիճք-Մասրիկ-Վարդենիս-Ձկնագետ-Մաքենիս-Գավառագետ (ըստ կենսազանգվածի): Արդյունքների վերլուծությունը ցույց է տվել, որ 1990-1991 թթ.-ին և 2010 թ.-ի ընթացքում գետերում որական և քանակական ցուցանիշներով դոմինանտել են դիատոմային ջրիմուռները, սակայն 1990-1991 թթ.-ին կանաչ ջրիմուռները ներկայացել են առավել հարուստ տեսակային կազմով, իսկ կապտականաչ ջրիմուռները՝ համեմատաբար աղքատ: 1990-1991թթ. ընթացքում գետերում, ըստ սապրոբայնության աստիճանի, գերակայել են β-մեզոսապրոբ տեսակները, ինչը փաստել է գետերի թույլ օրգանական աղտոտվածության մասին [9]: 2010 թ. Սևանա լճի հիմնական վտակներում հայտնաբերված 124 տեսակներից 91-ը հանդիսացել են ջրերի օրգանական աղտոտվածության կենսաինդիկատորներ, որոնցից 46 %-ը հանդիսացել են β-մեզոսապրոբ տեսակներ, 20 %-ը՝ o-β-մեզոսապրոբ, 7 %-ը՝ α-մեզոսապրոբ, 7%-ը՝ β-α-մեզոսապրոբ, մնացածը եղել են խառը տեսակներ: Ելնելով β-մեզոսապրոբ տեսակների տոկոսային առավելությունից և ընթացիկ բարձր քանակական ցուցանիշներից՝ Սևանա լճի հիմնական վտակները կարելի է դասել β-մեզոտրոֆ ջրային էկոհամակարգերի խմբին:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. *Абакумов В.А.* Руководство по методам гидробиологического анализа поверхностных вод и донных отложениях, Ленинград ,,Гидрометеоиздат,, с. 79-91, 1983.
2. *Баринова С.С., Медведева Л.А.* Атлас водорослей-индикаторов сапробности (Российский Дальний Восток). Владивосток; Дальнаука, 364 с., 1996.
3. *Бухтиярова Л.Н. Bacillariophyta* в биомониторинге речных экосистем. Современное состояние и перспективы использования. Альгология, *9*, 3, с. 89-103,1999.
4. *Давыдова Н.Н.* Диатомовые водоросли–индикаторы природных условий водоемов в голоцене., Л., изд.-во '' Наука", 243 с., 1985.
5. *Киселев И.А., Зинова А.Д., Курсанов Л.И.* Определитель низших растений. Водоросли, *2*, М., 312 с., 1953.
6. *Макрушин А.В.* Библиографический указатель по теме "Биологический анализ качества вод" с приложением списка видов-индикаторов. Л., 60 с., 1974.
7. *Оганесян Р.О.* Озеро Севан вчера, сегодня... , Ереван, с. 478, 1994.
8. *Прошкина-Лавренко А.И., Макарова И.В.* Водоросли Каспийского моря. Изд-во ,,Наука,, , Л., 205 с. 1968.
9. *Худоян А.А.* Фитопланктон основных притоков озера Севан. Дисс. канд. на соиск.учен. ст. биол. наук, Ереван, 1994.
10. *Хурсевич Г.К.* История развития диатомовой флоры озер Нарочанского бассейна. Минск: Наука и техника, 152с. ,1976.
11. *Царенко П.М.* Краткий определитель хлорококковых водорослей Украинской ССР, с. 206, 1990.
12. *Streble H; Krauter D;* Das Leben im Wassertropfen. Prague, 415p., 2002.
13. *Heinz Streble,* Das Leben im Wassertropfen, Kosmos, Stuttgard, 2001.

Ստացվել է 04.10.2012

Հայաստանի Գիտությունների Ազգային Ակադեմիա
Национальная Академия Наук Армении
National Academy of Sciences of Armenia

Հայաստանի Կենսաբանական Հանդես
Биологический Журнал Армении
Biological Journal of Armenia

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

Յայաստանի կենսաբ. հանդես, 3(65), 2013

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՏԱՐԲԵՐ ՄԱՐԶԵՐԻՑ ՄԹԵՐՎԱԾ ԽՆԿԱԾԱՂԻԿ ՍՈՎՈՐԱԿԱՆԻ ԽՈՏԻ *(HERBA ORIGANI VULGARIS)* ՄԵՋ ՖԼԱՎՈՆՈԻԴՆԵՐԻ ԵՎ ԴԱԲԱՂԱՆՅՈՒԹԵՐԻ ՈՐԱԿԱՔԱՆԱԿԱԿԱՆ ՎԵՐԼՈՒԾՈՒԹՅՈՒՆԸ

Ա.Վ. ՄՈՂՐՈՎՅԱՆ

Մ.Հերացու անվան պետական բժշկական համալսարան
Ֆարմակոգնոզիայի ամբիոն
n.chichoyan@mail.ru

Կատարվել է ՀՀ ֆլորայի խնկածաղիկ սովորականի խոտի (*Herba Origani vulgaris*) ֆլավոնոիդների ու դաբաղանյութերի որակաքանակական վերլուծությունը: Հետազոտության արդյունքները ցույց տվեցին, որ ֆլավոնոիդների շարքում որակապես առկա են ֆլավոնոլներ, աուրոններ, ֆլավոններ, խալկոններ, կատեխիններ, անտոցիաններ: Ֆլավոնոիդների հանրագումարն ըստ լյուտեոլինի կազմում է 3.4-3.8%:

Պարզվեց, որ հումքում պարունակվում են կոնդենսված դաբաղանյութեր, որոնց քանակական պարունակությունը կազմում է 18-22 %: Հետազոտությունը ցույց տվեց, որ Հայաստանում վայրի աճող խնկածաղիկ սովորականի խոտը պարունակում է բարձրաքանակ կենսաբանորեն ակտիվ նյութեր:

Խնկածաղիկ սովորական – ֆլավոնոիդներ – դաբաղանյութեր – որակական, քանակական վերլուծություն

Проведен качественный и количественный анализ флавоноидов и дубильных веществ в траве душицы обыкновенной (*Herba Origani vulgaris*), произрастающей в различных регионах Армении. Результаты исследования показали, что в ряду флавоноидов присутствуют флавонолы, ауроны, флавоны, халконы, катехины, антоцианы. В итоге сумма флавоноидов по лютеолину составляет 3.4-3.8 %.

Результаты анализов показали, что в сырье содержатся конденсированные дубильные вещества, в количестве от 18 до 22%, а в траве душицы обыкновенной, произрастающей в различных регионах Армении, большое количество биологически активных веществ.

Душица обыкновенная – флавоноиды – дубильные вещества – качественный, количественный анализ

The qualitataive and quantitative analysis of flavonoids and tannins containing in Herba Origani vulgaris growing in native flora was studied. The presence of aurons, flavonols, flavones, chalcons, catechines, anthocyanes in the range of flavonoids was revealed. The sum of flavonoids by luteoline is 3.4-3.8%. that raw material contains condensed tannins (by regions). These results showed that the raw material (in content of 18-22%) can serve as source of biologically active substances such as flavonoids and tannins.

Oregano ordinary – flavonoids – tannins – quantitative, qualitative analysis

Վերջին տասնամյակում նկատվում է գործնական բժշկության մեծ հետաքրքրությունը բուսական ծագման դեղապատրաստուկների նկատմամբ: Սա դիտվում է ոչ միայն զարգացող (Հնդկաստան, Չինաստան, Վիետնամ և այլն), որոնք ավանդաբար կիրառում են վիթխարի տեսակազմով դեղաբույսեր, այլ նաև հզոր քիմիական արդյունաբերություն ունեցող զարգացած երկրներում (ԱՄՆ, Ճապոնիա, Գերմանիա և այլն [7]:

Ներկայումս գիտագրական շատ աղբյուրների ուշադրության կենտրոնում են այնպիսի կենսաբանորեն ակտիվ նյութեր, ինչպիսիք են ֆենոլային միացությունները, որոնք սինթեզվում են ծաղկավոր բույսերում [16]: Թեև գրական տվյալները շատ հաճախ իրար հակասում են, այնուամենայնիվ, ֆենոլային միացությունները՝ մասնավորապես, ֆլավոնոիդները և դաբաղային նյութերը, ունեն բժշկական լայն կիրառություն [12]: Հանդիսանալով բենզ- γ -պիրոնի ածանցյալներ, ֆլավոնոիդները, որպես երկրորդային կենսասինթեզի արգասիքներ, դրսևորում են բարձր կենսաբանական ակտիվություն [13]:

Ֆլավոնոիդները կարևոր նշանակություն ունեն մարդու օրգանիզմի համար. հակաօքսիդանտներ են, ունեն բակտերիցիդ, հակամանրէային, միզամուղ, հակաբորբոքային հատկություններ, հանդիսանում են ասկորբինաթթվի կայունացուցիչներ, օժտված են P վիտամինային ակտիվությամբ, կարգավորում են անոթային պատերի թափանցելիությունը, իջեցնում նրանց փխրունությունը [13, 16]: Ֆենոլային միացությունների շարքում պակաս կարևոր չեն դաբաղային նյութերը կամ տանիդները, որոնք պարունակվում են (20-30%) գրեթե բոլոր բարձրակարգ բույսերում, այդ թվում և՝ խուլեղինջազգիներ ընտանիքին (Lamiaceae) պատկանող շատ բույսերում:

Բժշկության մեջ դաբաղանյութերի կիրառումը պայմանավորված է նրանց կապող, հակաբորբոքային, բակտերիցիդ, արնեկանգ, հակաթունային, հակալուծային ազդեցությամբ [13]: Այս տեսանկյունից, գիտական մեծ հետաքրքրություն է ներկայացնում խնկածաղիկ սովորականի խոտը (*Herba Origani vulgaris*): Խնկածաղիկ սովորականի խոտը պարունակում է եթերայուղ (0.12% -1.2%), որի կազմում մտնում են ֆենոլներ (44%)՝ կարվակրոլ, թիմոլ, ցիմոլ, գերանիլացետատ (2.63% – 5%), սելինեն, α-տույոն, α-տերպինեն,մոնոտերպենային սպիրտներ, ֆլավոնոիդներ, դաբաղանյութեր (մինչև 19%), վիտամին C (ծաղիկներում՝ 166 մգ %, տերևներում՝ 565 մգ%, ցողունում՝ 58 մգ%) [18]: Գրականության մեջ արձանագրվել են բազմաթիվ աշխատանքներ, որոնք վերաբերում են աշխարհագրական տարբեր վայրերից մթերված խնկածաղիկների հումքերի քիմիական կազմի ուսումնասիրությանը [11]: Կատարվել է եթերայուղի, ֆենոլային միացությունների, դաբաղային նյութերի որակաքանակական վերլուծություն բույսի վեգետացիայի տարբեր փուլերում [4, 9, 10,17]:

Վերլուծելով գիտագրական աղբյուրները, հետազոտության նպատակը համարեցինք հայրենական ֆլորայի տարբեր բնակլիմայական պայմաններում աճող խնկածաղիկ սովորականի (*Origanum vulgare* L.) խոտի մեջ կենսաբանորեն ակտիվ նյութերի՝ ֆլավոնոիդների ու դաբաղանյութերի, որակաքանակական բաղադրության ուսումնասիրումը:

Նյութ և մեթոդ: Որակական և քանակական հետազոտությունների համար հումք է ծառայել 2012 թ.՝ հուլիս-օգոստոս ամիսներին մթերված Տավուշի, Կոտայքի (Հրազդան), Գեղարքունիքի (Սևան), Լոռու մարզերի խնկածաղիկ սովորականի խոտը [6]:

Ֆլավոնոիդների ու դաբաղանյութերի հայտնաբերման համար կատարվել են գունավորման և նստեցման ռեակցիաներ:

Որակական ռեակցիաների համար օգտագործվել են դեղաբուսական հումքի ջրային (դաբաղանյութերի համար) և սպիրտային (ֆլավոնոիդների համար) լուծամզվածքները [6]: Ֆենիլ–բենզ–γ–պիրոնի օղակի ու ֆլավոնոիդների առանձին տեսակների հայտնաբերման համար կիրառվել են վերականգնման ռեակցիաներ [14]:

Դաբաղանյութերի քանակական որոշման նպատակով (հումքի ջրային լուծամզվածքում) օգտագործվել են գրավիմետրիկ և տիտրման մեթոդները [2,6]:

Հումքի սպիրտային լուծամզվածքում ֆլավոնոիդների հանրագումարն ըստ լյուտեոլինի, որոշվել է Գեորգիևսկու մեթոդի համաձայն՝սպեկտրոֆոտոմետրիկ եղանակով: Լուծույթների օպտիկական խտությունները չափվել են СФ-46 սպեկտրոֆոտոմետրով, 10 մմ կյուվետում, 315 նմ ալիքի տիրույթում [5]:

Հետազոտությունները կատարվել են ԵՊԲՀ Ֆարմակոգնոզիայի ամբիոնում և ՀՀ ԳԱԱ հիդրոպոնիկայի պրոբլեմների ինստիտուտի լաբորատորիայում:

Արդյունքներ և քննարկում: Հետազոտության արդյունքները ցույց տվեցին, որ, խնկածաղիկ սովորականի հումքը պարունակում է կոնդենսված դաբաղանյութեր, ֆլավոնոլներ, ֆլավոններ, աուրոններ, խալկոններ, կատեխիններ, անտոցիաններ (աղ. 1, 2): Ընդ որում, ծաղկման սկզբում տարբեր մարզերից մթերված հումքում դաբաղային նյութերի և ֆլավոնոիդների քանակական պարունակությունը համապատասխանաբար կազմեցին 18-22.3% և 3.4-3.84% (աղ. 3): Բնականաբար, քանակական այս տարբերությունները պայմանավորված էին աշխարհագրական և տեխնոգեն մի շարք գործոններով:

Աղ.1. Խնկածաղիկ սովորականի խոտի՝ ջրային հանուկում դաբաղային նյութերի որակական հայտնաբերման արդյունքները

Ռեակտիվ	Գույնը	Հայտնաբերվող նյութը
10%-անոց NaOH	Ձեյթունականաչ	Դաբաղային նյութեր
Երկաթ-ամոնիակային շիբի 1%-անոց սպիրտային լուծույթ	Կանաչասև	Կոնդենսվող դաբաղանյութեր
10%-անոց քացախաթթվի ու 10%-անոց կապարի ացետատի լուծույթ	Կանաչասև	Կոնդենսվող դաբաղանյութր
1%-անոց ժելատինի լուծույթ	Պղտորություն	Դաբաղայի նյութեր
Խինինի աղաթթվային լուծույթ	Սպիտակադեղին նստվածք	Դաբաղային նյութեր

Աղ.2. Խնկածաղիկ սովորականի խոտի՝ սպիրտային հանուկում ֆլավոնոիդների որակական հայտնաբերման արդյունքները

Ռեակտիվ	Գույնը	Հայտնաբերվող նյութը
Ցիանիդինային ռեակցիա (Սինոդի փորձ)	Նարնջակարմիր	Ֆլավոնոլներ
Mg, խիտ HCl, 95^{0} սպիրտ	Կարմիր	Ֆլավոնոիդներ
$AlCl_3$-ի 2%-անոց սպիրտային լուծույթ	Դեղնականաչ	Ֆլավոնոիդներ
0.5%-անոց $FeCl_3$-ի սպիրտային լուծույթ	Կանաչ	Դիօքսիֆենոլային ֆլավոնոիդներ
Կապարի ացետատի 10%-անոց լուծույթ	Դեղնանարնջագույն	Աուրոններ, ֆլավոններ, խալկոններ
HCl	Կարմիր	Խալկոններ, աուրոններ, կատեխիններ, անտոցիաններ
Հիմքի 1%-անոց սպիրտային լուծույթ	Դեղին	Ֆլավոններ

Աղ.3. Խնկածաղիկ սովորականի օդաչոր հումքի դաբաղային նյութերի (ջրային հանուկում) և ֆլավոնոիդների (սպիրտային հանուկում) քանակական պարունակությունն ըստ մարզերի (n=6)

Մարզ	Դաբաղանյութերի քանակական պա-րունակությունը,%		Ֆլավոնոիդների հանրագումարն ըստ լյուտեոլինի, %		Ֆլավ. հանրագումարն ըստ լյուտեոլինի տրա-մաչափիչ գրաֆիկի, մկգ	Օպտիկական խտություն
	M±m	p	M±m	p		
Կոտայք	22.29±0.57	0.032	3.84±0.40	0.933	76×10^{-6}	0.6325
Տավուշ	20.36±0.53		3.80±0.34		75×10^{-6}	0.6245
Լոռի	18.17±0.67	0.882	3.53±0.44	0.858	69.8×10^{-6}	0.588
Գեղարքունիք	18.03±0.63		3.41±0.46		69×10^{-6}	0.5875

Պարզվեց, որ Կոտայքի մարզում, որտեղ, ըստ գրականության տվյալների՝ գերակշռում են կավաավազային չեզոք լեռնային սևահողերը, երկաթի հանքավայրերը, բարձր խոնավությունը, արևի ջերմությունը [1], խնկածաղիկ սովորականի խոտում ֆլավոնոիդների հանրագումարն ըստ լյուտեոլինի տրամաչափիչ գրաֆիկի (C) կազմեց 76 մկգ, օպտիկական խտությունը (D)՝ 0.6325, ֆլավոնոիդների քանակական պարունակությունը՝ 3.84 %, իսկ դաբաղանյութերի քանակական պարունակությունն ըստ տանինի՝ 22.3%: Վերջինս ամենաբարձր ցուցանիշն էր մյուս մարզերի համեմատ: Տավուշի մարզում վայրի աճող խնկածաղիկ սովորականի խոտում գրանցվեցին հետևյալ ցուցանիշները՝ ֆլավոնոիդների հանրագումարն ըստ լյուտեոլինի տրամաչափիչ գրաֆիկի (C) 75 մկգ, օպտիկական խտությունը (D) 0.6245, ֆլավոնոիդների քանակական

պարունակությունը՝ 3.8%, դաբաղանյութերինը՝ 20.4%: Նման ցուցանիշները միանշանակ կարելի է բացատրել այս մարզին բնորոշ բնակլիմայական առանձնահատկություններով. բազմամետաղային հանքավայրեր, անտառային գորշ կրազերծ հողեր (հումուսը՝ 5.9%, pH<7), տարեկան 1930 ժ արևոտություն, խոնավ կլիմա, չափավոր ջերմություն [1]:

Լոռու մարզում աճող խնկածաղիկ սովորականի խոտում ֆլավոնոիդների հանրագումարն ըստ լյուտեոլինի տրամաչափիչ գրաֆիկի (C) կազմեց 69.8 մկգ, օպտիկական խտությունը՝ (D) 0.5875, ֆլավոնոիդների քանակական պարունակությունը՝ 3.5 %, դաբաղանյութերինը՝ 18.2 %: Լոռու մարզը հարուստ է հանքային տարրերով (գերակշռում են Cu, Mo, Au): Մասնավորապես, պղնձի առկայությունը (որն արդեն հայտնաբերվել է խնկածաղիկ սովորականի հումքի մոխրում) կարող է նպաստել այս մարզից մթերված հումքի ֆլավոնոիդների հակաօքսիդանտային ազդեցության ուժգնացմանը:

Գեղարքունիքի մարզում, ուր շատ են քրոմի, հրաքարային, ծծմբաքարային հանքային դաշտերը, արևոտությունը տարեկան 2780 ժ է, հողի մակերևույթի ջերմաստիճանը՝ -2^{0}C-ից մինչև 15^{0}C [1], խնկածաղիկ սովորականի խոտում ֆլավոնոիդների հանրագումարն ըստ լյուտեոլինի (C) կազմեց 69 մկգ, օպտիկական խտությունը՝ (D) 0.588, ֆլավոնոիդների քանակական պարունակությունը՝ 3.4%, դաբաղանյութերինը՝ 18%: Համաձայն ՊՖ 11-ի՝ խնկածաղիկ սովորականի չոր, ամբողջական կամ մանրեցված հումքում ֆլավոնոիդների հանրագումարն ըստ լյուտեոլինի պետք է կազմի 1 %-ից ոչ ցածր: [4]: Այսպիսով, հետազոտության արդյունքները փաստում են, որ խնկածաղիկ սովորականը ծաղկման սկզբում կուտակում է նյութեր, որոնք կատարում են պաշտպանական դեր: Դրանք դաբաղային և ֆենոլային միացություններն են: Նրանք բույսին պաշտպանում են ֆիտոֆագերից, ապահովում են մանրէասպան, սնկասպան ազդեցությունը, պատնեշ հանդիսանում մուտագեն այն գործոնների համար, ինչպիսիք են քիմիական և ջերմային ազդեցությունները [3]:

Կան կարծիքներ, որոնց համաձայն ֆենոլային միացությունները մեծ քանակով կուտակվում են ծաղկման սկզբում [9]: Սա բացատրվում է նրանով, որ պոլիֆենոլօքսիդազ ֆերմենտը, որը մոլեկուլային թթվածնի ներկայությամբ ֆենոլներին ու նրանց ածանցյալներին օքսիդացնում է մինչև խինոնների, հայտնաբերվել է մինչև ծաղկումը [15]: Իսկ արդեն ծաղկման սկզբում դիտվում է դաբաղանյութերի, ֆլավոնոիդների կուտակման դինամիկայի աճ՝ ֆենոլային միացությունների մեծ քանակության շնորհիվ: Համեմատելով տարբեր մարզերից մթերված հումքում պարունակվող դաբաղանյութերի ու ֆլավոնոիդների քանակական պարունակությունը, ակնհայտորեն ամեմամեծ քանակը նկատվում է Կոտայքի մարզում, իսկ համեմատաբար քիչ քանակը՝ Գեղարքունիքում, չնայած նրան, որ հավաքը կատարվել է նույն ամիսներին: Երկու մարզերում էլ լուսավորությունը, ջերմությունը բավականին բարձր են, գրեթե՝ միանման: Կարելի է ենթադրել, որ պատճառը խոնավության ապահովման մակարդակի մեջ է, որը բերում է հողի չորացման, բույսն ունենում է խոնավության պակաս, որն իր ազդեցությունն է թողնում նյութափոխանակության վրա: Մինչդեռ Կոտայքի մարզում, որտեղ հողն ունի մեծ ծավալային կշիռ, բարձր ծակոտկենություն և խոնավություն, կուտակվում են ավելի մեծ քանակով դաբաղային նյութեր և ֆլավոնոիդներ: Իսկ մեծ քանակով դաբաղանյութերի կուտակմանն ու կենսասինթեզին նպաստում է մարզի հողերի՝ ազոտով ու ֆոսֆորով սակավայնությունը [1,8]:

Վերջինիս վկայությունն էր խնկածաղկի խոտի նախապես որոշված հանքային կազմի մեջ ազոտի և ֆոսֆորի բացակայությունը: Նշենք նաև, որ խնկածաղիկ սովորականին բնորոշ է քիմիական կազմի փոփոխությունը [12]: Պետք է հաշվի առնել վերջինիս վրա ազդող գործոնները (վեգետացիայի շրջանները, տարվա եղանակը, հավաքի ու չորացման պայմանները), որոնք առավելագույնս ներգործում են երկրորդային կենսասինթեզի ակտիվ նյութերի առաջացման ու շարժման վրա:

Հաստատվեց ՀՀ ֆլորայի վայրի աճող խնկածաղիկ սովորականի խոտի ֆլավոնոիդների և դաբաղանյութերի որակաքանակական կազմը: Ֆլավոնոիդների շարքում

հայտնաբերվել են ֆլավոններ, ֆլավոնոլներ, աուրոններ, խալկոններ, կատեխիններ, անտոցիաններ: Պարզվեց, որ Հայաստանում աճող խնկածաղիկ սովորականի խոտը պարունակում է կոնդենսված տիպի դաբաղանյութեր: Պարզվեց, որ բույսում պարունակվող դաբաղանյութերի ու ֆլավոնոիդների որակական կազմը կախված չէ աշխարհագրական վայրից, ինչը չի կարելի ասել նրանց քանակական պարունակության մասին: ՀՀ 4 մարզերում (Կոտայք, Տավուշ, Լոռի, Գեղարքունիք) աճող խնկածաղիկ սովորականի խոտում պարունակվող դաբաղանյութերի քանակական պարունակությունը համապատասխանաբար կազմում է 18%, 18.2%, 20.4%, 22,3%, իսկ ֆլավոնոիդներինը՝ 3.4%, 3.5%, 3.8%, 3.84%: ՀՀ ֆլորայի խնկածաղիկ սովորականի հումքը, ֆենոլային միացությունների քանակական պարունակության տեսանկյունից լիարժեք համապատասխանում է Միջպետական ստանդարտի պահանջներին:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. Հայկական Սովետական Հանրագիտարան, N 12, Երևան, 752 էջ, 1987:
2. Ռևազովա Լ.Վ., Չիչոյան Ն.Բ. Ֆարմակոգնոզիա: Գործնական պարապմունքների ձեռնարկ, Երևան, ԵրՊԲՀ, 343 էջ, 2000:
3. *Барабой В.А.* Растительные фенолы и здоровье человека, Наука, 160 с., 1984.
4. *Бойко Е.Ф.* Оценка качества растительного сырья *Origanum vulgare* L., Труды Никитского ботанического сада, Симферополь, Институт эфиромасличных и лекарственных растений НААН Украины, *133*, с. 28-40, 2011.
5. *Георгиевский В.П., Комиссаренко Н.Ф., Дмитрук С.Е.* Биологически активные вещества лек. растений, под ред. Т.П. Березовской, Новосибирск, Наука, Сибирское отделение, с. 217-218, 1990.
6. ГФ XI Издательство “Медицина”, М., 1987.
7. *Дячок В.В., Кожарская И.М., Лебединец Л.А.* Количественное определение терпеноидов в комплексном фитопрепарате, Химико-фармацевтический журнал, *38*, 9, с. 26, 2004.
8. *Запрометов М.Н.* Фенольные соединения: распространение, метаболизм и функции в растениях, Наука, с. 272, 1993.
9. *Киреева Т.Б., Китова Е.А.* Экологические и онтогенетические особенности накопления дубильных веществ в траве душицы обыкновенной в условиях Удмуртии, Вестник Удмуртского университета, 10, с. 85-96, 2006.
10. *Коротков И.В.* Комплексная оценка ресурсов эфиромасличных лекарственных растений подзоны Южной Тайги Пермского края, Пермь, с. 17-21, 2007.
11. *Лупинская С.М., Орехова С.В., Васильева О.Р.* Изучение биологически активных веществ липы, крапивы, душицы и сывороточных экстрактов на их основе, Химия растительного сырья, 3, с. 143-145, 2010.
12. *Мирович В.М., Коненкина Т.А, Федосеева Г.М., Головных Н.Н.* Химия растительного сырья, 2, с. 61-64, 2008.
13. *Муравьева Д. А.* Фармакогнозия, Учебник 3 изд., М., с. 463- 492, 1991.
14. Практикум по фармакогнозии под ред. проф. Ковалева В.Н., Учебное пособие для студентов высших учебных заведений, Харьков, изд. НФаУ “Золотые страницы”, “МТК - Книга”, с. 126, 2004.
15. *Рубин Б.А.* Курс физиологии растений, Высш. шк., с. 576, 1976.
16. *Смык Г.К., Гурьянов Б.М.* Целебные растения в нашей жизни, Киев, Общество “Знание” Украинской ССР, с. 4, 1988.
17. *Станкявичене Н.А., Юнкявичене Г.К., Моркунас А.В.* Качественная и количественная характеристика эфирных масел душицы обыкновенной, культивируемой в ботаническом саду А.Н. Литовской ССР, Симферополь, с. 252-253, 1980.
18. Фитотерапия с основами клинической фармакологии. Справочник под ред. Кукеса В.Г., “Медицина”, М., с. 45, 1999.

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

Биолог. журн. Армении, 3 (65), 2013

ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИИИ НА АМИДНЫЕ ГРУППЫ БЕЛКОВ ПЕЧЕНИ КРЫС

А.С. ДИЛБАРЯН

Ереванский госуниверситет, кафедра биохимии
alladil1777@mail.ru

Исследовалась амидированность белков печени крыс, подверженных гипоксии, и изменение содержания амидных групп белков при инкубировании гомогенатов печени. Показано, что в условиях гипоксии происходит амидирование белков печени, присущее процессам торможения. В течение 3-часовой инкубации наблюдается дезамидирование в суммарной, легко- и трудногидролизуемых фракциях амидных групп белков печени, что позволяет предположить, что амидные группы белков печени крыс, подверженных гипоксии, причастны к аммиакообразованию, наблюдаемому при инкубации гомогенатов печени.

Гипоксия – амидные группы белков –инкубирование гомогенатов – аммиакообразование

Հետազոտվել է հիպօքսիայի ենթարկված առնետների լյարդի սպիտակուցների ամիդացումը, ինչպես նաև սպիտակուցների ամիդային խմբերի պարունակության փոփոխությունը լյարդի հոմոգենատները ինկուբացնելիս: Ցույց է տրված, որ հիպօքսիայի պայմաններում տեղի է ունենում լյարդի սպիտակուցների ամիդացում, արգելակման պրոցեսներին բնորոշ: Երեք ժամյա ինկուբացիայի ընթացքում դիտվում է գումարային դեզամիդացում, հեշտ և դժվար հիդրոլիզվող ամիդային խմբերի ֆրակցիաներում, ինչը թույլ է տալիս ենթադրել, որ հիպօքսիայի ենթարկված առնետների լյարդի սպիտակուցների ամիդային խմբերը մասնակցում են ամոնիակառաջացմանը, որը դիտվում է լյարդի հոմոգենատները ինկուբացնելիս:

Հիպօքսիա – սպիտակուցների ամիդային խմբեր –հոմոգենատների ինկուբացիա – ամոնիակառաջացում

Amidation of rat liver proteins, as well as changes in the content of amide groups during incubation of liver homogenates have been studied. It is shown, that under hypoxia take place amidation of liver proteins, which is also typical for inhibition processes. The amidation of liver proteins takes place under the hypoxia, the desamidation in fractions of total, easy and hard hydrolysable amide groups of rat liver proteins was observed during 3 hour incubation. They take part in ammonia formation processes, which observed during incubation of liver homogenates.

Hypoxia –protein amide groups – incubation of homogenates – ammonia formation

Амидным группам белков тканей придается определенное значение в механизмах аммиакообразования и нейтрализации аммиака. Предполагалось участие белковых амидных групп и в процессе интенсивного аммиакообразования, происходящего при инкубации гомогенатов тканей. Однако в результате детального изучения этого вопроса была исключена ранее допускаемая возможность дезамидирования белков, поскольку суммарное содержание амидных групп белков, тщательно промытых липорастворителями ТХУ-осадков гомогенатов мозга и печени, при инкубации гомогенатов не изменялось [1, 2]. Было показано, что при инкубации гомогенатов

печени в присутствии L-аминокислот наблюдаемый прирост аммиака также не сопровождается дезамидированием белков [3].

Имеются многочисленные данные об изменении амидированности белков, особенно мозга, при различных функциональных и экстремальных состояниях организма. Доказано, что при процессах возбуждения, вызванных электрическим раздражением [7], гипероксией [5, 9], при введении инсулина [13], камфоры [7], наряду с интенсивным расходованием энергетических субстратов, происходит дезамидирование белков тканей. И наоборот, при протекании тормозных процессов, в частности во время естественного сна, зимней спячки [4], при мединаловом [13] и нембуталовом наркозе [6], происходит амидирование белков тканей. Показано также увеличение амидированности белков тканей при действии вибрации на организм [12].

Целью настоящий работы является исследование амидированности белков печени крыс при гипоксии и динамики амидных групп при инкубировании гомогенатов печени крыс, подвергнутых гипоксии.

Материал и методика. Объектом исследования служили белые крысы массой 150-200 г. Подопытные животные были разделены на 2 группы:1 – интактные; 2 – подвергались гипоксии в барокамере, где создавалось давление 335 мм рт.ст., соответствующее высоте 6 км над уровнем моря. Животных обеих групп подвергали декапитации, извлекали мозг и гомогенизировали в гомогенизаторе типа Поттер-Эльвенджема в 0.05 М K^+-фосфатном буфере, рН 7,4. До и после 3-часовой инкубации гомогенатов определяли в предварительно очищенных от азотсодержащих соединений и липидов ТХY-осадках гомогенета печени белковый амидоазот. Очистку проводили следующим образом: ТХУ-осадок трижды промывали 5%-ной ТХУ по 15 мин, последнюю проводили на водяной бане при 90°С в течение 30 мин; осадок обрабатывали последовательно органическими растворителями: смесью этанола с хлороформом (2:1) 5мл, 15 мин; этанолом 5 мл, 15 мин; смесью этанола с эфиром (2:1) 5 мл, 15 мин (обрабатывали дважды, вторую обработку проводили при 70°С); трижды эфиром 5 мл, 10 мин.

Амидные группы белков определяли по количеству аммиака, выделившегося при гидролизе очищенного осадка в 1N H_2SO_4 при 100°С. При определении суммы амидных групп (САГ) осадки подвергали гидролизу в течение 180 мин, при определении легкогидролизуемых амидных групп (ЛАГ), принадлежащих аспарагину, – 30 мин. Трудногидролизуемые амидные группы (ТАГ), принадлежащие глутамину, определяли по разности САГ и ЛАГ [8]. Содержание аммиака в предварительно нейтрализованном гидролизате определяли микродиффузионным методом Зелингсона в модификации Силаковой [11]. Статистическую обработку полученных данных проводили методом Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Данные, полученные при исследовании амидированности белков печени интактных и подверженных гипоксии крыс, приведены в табл. 1 и 2.

Согласно полученным данным (табл. 1), при 3-часовой инкубации гомогенатов САГ белков печени в интактной группе животных не меняется и составляет 29,88 мкМ/г и 29,75 мкМ/г до и после инкубации соответственно, что подтверждает ранее сделанное заключение о непричастности амидных групп белков печени к аммиакообразованию, происходящему при инкубации гомогенатов [2].

В течение инкубации наблюдается некоторое перераспределение амидного азота между ЛАГ (17.37 мкМ/г до –14,9 мкМ/г после инкубации) и ТАГ (12,51 мкМ/г до и 14,85 мкМ/г после инкубации), в результате которого в легкогидролизуемой фракции происходит уменьшение амидоазота на 2,47 мкМ/г после инкубации гомогената, а в трудногидролизуемой, наоборот, увеличение последнего на 2,34 мкМ/г. Следует подчеркнуть, что и ряд других авторов указывал на перераспределение между фракциям и амидных групп белков при различных функциональных состояниях в результате трансконформационных изменений последних [10].

Результаты исследований амидированности белков печени крыс, подвергнутых гипоксии, приведены в табл. 2.

Табл. 1. Содержание амидного азота белков печени крыс до и после трехчасовой инкубации гомогенатов, мкМ/г свежей ткани, n=8, p<0,001.

Условия ошыта	САГ	ЛАГ	ТАГ
До инкубации	29,88±1,37	17,37±1,30	12,51±0,67
После инкубации	29,75±1,62	14,90±1,35	14,85±0,73
Разница	0,13	2,47	2,34

Табл. 2. Содержание амидного азота белков печени крыс, подверженных гипоксии, до и после трехчасовой инкубации гомогенатов, мкМ/г свежей ткани, n=8, p<0,001

Условия ошыта	САГ	ЛАГ	ТАГ
До инкубации	35,50±0,52	22,70±1,06	12,80±1,26
После инкубации	29,85±1,11	19,13±0,69	10,72±1,51
Разница	5,65	3,57	2,08

Как видно из полученных данных, под воздействием гипоксии САГ белков печени увеличивается и составляет 35,50 мкМ/г, что превосходит суммарное содержание амидных групп у интактных животных на 5,62 мкМ/г. Очевидно, под воздействием гипоксии происходит амидирование белков печени, что имеет место при развитии тормозных процессов.

При инкубации гомогенатов печени крыс, подверженных гипоксии, наблюдается иная картина, нежели у интактных животных. В экспериментах с гипоксией в течение трехчасовой инкубации происходит уменьшение САГ белков печени с 35,50 мкМ/г до 29,85 мкМ/г, что свидетельствует о дезамидировании амидных групп белков печени на 5,65 мкМ/г амидоазота.

Содержание ЛАГ в белках печени крыс под действием гипоксии, также как и САГ, увеличивается по сравнению с интактными животными и составляет 22,7 мкМ/г, т.е. происходит амидирование белков этой фракции на 5,33 мкМ/г. Во время инкубации гомогената наблюдается обратный процесс – дезамидирование белков печени на 3,57 мкМ/г амидозота. Количество же ТАГ под действием гипоксии увеличивается всего на 0.29 мкМ/г, однако в течение инкубации гомогенатов печени наблюдается дезамидирование этой фракции на 2,08 мкМ/г амидоазота.

На основании приведенных данных можем заключить, что амидирование белков печени крыс в условиях гипоксии происходит за счет легкогидролизуемой фракции, принадлежащей аспарагину. Амидированные при гипоксии белки печени крыс, в отличие от белков интактных животных, принимают участие в аммикообразовании, происходящем в течение 3-часовой инкубации гомогенатой печени.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бадалян И.А., Давтян М.А.* Амидные группы белков и аммиакообразование в головном мозгу крыс. Нейрохимия. *5*, 4, с. 384-390, 1986.
2. *Бадалян И.А., Давтян М.А.* Амидные группы белков и процесс аммиакообразования в печени крыс. Биолог. журн. Армении, *34*, 11, с. 986-987, 1986.
3. *Бадалян И.А., Григорян А.Л.* Влияние аминокислот на амидные группы белков печени. Ученые записки ЕГУ, *3*, с. 151-153, 2005.
4. *Владимирова Е.А.* Аммиак головного мозга как специфический биохимический показатель функционального состояния центральной нервной системы. – В кн. “Биохимия нервний системы“, Киев, изд-во АН Укр. ССР, с. 47-62, 1954.

5. *Гершенович З.С., Кричевская А.А.* Амидные и карбоксильные группы белков печени при кислородной интоксикации. Биохимия, *25*, 2, с. 310-317, 1960.
6. *Кометиани П.А.* О метаболической активности амидного азота белков головного мозга. Биохимия, *35*, 2, с. 394-403, 1970.
7. *Кометиани П.А., Клейн Е.Э., Иорданишвили Г.С., Гвалия Н.В., Чикваидзе В.Н.* Пути образования и устранения аммиака в головном мозгу. В кн. „Вопросы биохимии нервной мышечной систем“. Тбилиси, изд-во Мецниереба, с. 41-63, 1965.
8. *Кричевская А.А., Лукаш А.И., Пушкина Н.В., Херувимова В.А.* Амидированность белков печени позвоночных и возможные причины разной прочности амидной связи. Ж. эволюц. биохим. и физиол., *2,* с. 206-208, 1973.
9. *Новикова Е. И.* Действие гипероксии на белки сыворотки крови и печени крысы. Ростовский ун-т, Ростов-на-Дону, Деп. в Винити 12 августа 1980, 3555-80, 1980.
10. *Папян А.А.* Амидные группы белков мозга при умирании и оживлении организма. Журн. экспер. и клинич. медицины. *14*, 5, с. 28-32, 1974.
11. *Силакова А.И., Труш Г.П., Явилякова А.* Микрометод определения аммиака и глютамина в тканевых трихлоруксусных экстрактах. Вопросы мед. химии, *8*, 5, с. 538-544, 1962.
12. *Симонян Л.П, Папян К.М., Бадалян И.А.* Влияние вибрации на аммиакообразование в мозгу крыс. Материалы республиканской молодежной научной конфеpанции. Экологическая наука в Армении, с. 146-153, 2001.
13. *Тяхепылд Л.Я.* Дезамидирование белков печени и изменение их макроструктуры под влиянием инсулина. ДАН ССР, *147*, 4, с. 964-966, 1962.

Поступила 26.03.2013

Հայաստանի Գիտությունների Ազգային Ակադեմիա | Հայաստանի Կենսաբանական Հանդես
Национальная Академия Наук Армении | Биологический Журнал Армении
National Academy of Sciences of Armenia | Biological Journal of Armenia

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

Биолог. журн. Армении, 3 (65), 2013

МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ В ИССЛЕДОВАНИИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БРОМИСТОГО ЭТИДИЯ С ДНК

Г.Р. ВАРДАПЕТЯН, Л.С. УНАНЯН

Российско-Армянский (Славянский) университет,
Институт математики и высоких технологий
hvardapetyan@mail.ru, lhunanyan@mail.ru

Методом молекулярной динамики изучено взаимодействие бромистого этидия (БЭ) с молекулой ДНК. Рассчитаны пространственные и энергетические параметры связывания ДНК-БЭ. Проведен сравнительный анализ экспериментально выявленных параметров связывания разными методами и параметров ММД.

ДНК – БЭ – константа связывания (К) – ММД

Ուսումնասիրված է բրոմական էթիդիումի (ԲԷ) և ԴՆԹ-ի մոլեկուլի փոխազդեցությունը՝ մոլեկուլային դինամիկայի մեթոդի օգնությամբ: Հաշվարկված են փոխազդեցության տարածական և էներգիական ցուցանիշները: Կատարված է մոլեկուլային դինամիկայի մեթոդի և այլ մեթոդների օգնությամբ ստացված տվյալների համեմատական վերլուծություն:

ԴՆԹ – ԲԷ – կապման հաստատուն (К) – ՄԴՄ

The interaction of ethidium bromide (EB) with the DNA by the method of molecular dynamics was studied. The geometric and energy parameters of DNA-ethidium bromide connectivity had been calculated. A comparative analysis of the experimentally identified connectivity parameters by different methods and parameters MMD had been carried out.

DNA – EB – connectivity constant (К) – MMD

Как известно, ДНК в клетке окружена молекулами различной природы и в процессе реализации биологических функций может образовать с этими соединениями комплексы различной природы. Из них наиболее важное значение имеют биологически активные природные соединения различной природы, а также лекарственные препараты. При этом возможны взаимодействия как ковалентным, так и нековалентными способами. В связи с этим, исследование способов и параметров связывания лигандов различной природы с ДНК является одной из важнейших задач современной молекулярной биологии. Исследование параметров связывания известными биофизическими и физико-химическими методами является достаточно трудоемким процессом, зависящим от чувствительности аппаратуры и условий эксперимента.

В основе методов молекулярной динамики (ММД) лежит модельное представление о многоатомной молекулярной системе, в которой все атомы представляют собой материальные точки [6, 7, 24]. Этот метод позволяет вычислить траектории как атомов, так и полимерных цепей. Также дает

возможность исследовать динамику взаимодействия различных соединений друг с другом в разных пространственно-временных критериях: начиная с нескольких нанометров и на временных отрезках в несколько наносекунд [10, 23].

Целью настоящей работы являлось исследование взаимодействия бромистого этидия (БЭ) с ДНК методом молекулярной динамики.

БЭ – химическое соединение из группы фенантридинов (3,8-диамино-6-этил-5-фенилфенантридиум бромид). Он широко используется как флуоресцентная метка для выявления ДНК [31], обладает мутагенными и канцерогенными свойствами [13, 32] и используется как химиотерапевтический агент [33].

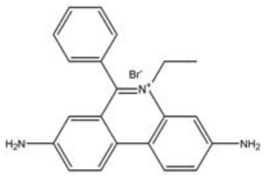


Рис.1. Химическая структура БЭ.

Выбор БЭ обусловлен большим количеством исследований, в которых выявлены параметры и способы его связывания с ДНК. Определены доступные сайты, силы и константы связывания в зависимости от разных физико-химических параметров [1-5, 25, 27, 28].

Материал и методика. Для создания модели молекулы БЭ были использованы различные программы по биомоделированию. Были предусмотрены все параметры для низкомолекулярных соединений, получены силовые поля и сгенерирован топологический файл для БЭ с использованием программ по биомоделированию [12, 14, 21, 22, 29, 30].

Для моделирования взаимодействия был создан фрагмент двуцепочечного ДНК в соответствии с принятыми протоколами по биомоделированию [20], состоящий из 26 пар оснований со следующей последовательностью:

CCAGGTCGCAGTGACCTGCGGCAGTC

2 10 20 26

Для проведения эксперимента было создано пространство додекаэдерного типа с диаметром 176 A^0, длиной ребра 74.54 A^0 и объемом 3173.75 нм^3; количество воды и ионов составили 41277 мол.

Продолжительность времени комплексирования – 10 нс, процедура МД протекала с временным шагом $\Delta t = 2$ фс при постоянной температуре T= 30^{0}K и давлением в 1 атм.

Координаты всех атомов записывались каждые 2 пс. Расчетные критерии радиуса взаимодействия рассчитывались по стандарту: для кулоновских взаимодействий – 0.9нм, ван-дер-ваальсовских взаимодействий – 1.4 нм [15].

Для расчета энергии комплексообразования БЭ с ДНК – ΔG_{total} было использовано уравнение 1 [9, 18].

$$\Delta G_{total} = \Delta G_{vdw} + \Delta G_{el} + \Delta G_{pe} + \Delta G_{hyd} + \Delta G_{entr}, \qquad (1)$$

где G_{vdw} – вклад ван-дер-ваальсовых взаимодействий (межмолекулярных и с водным окружением); ΔG_{el} – электростатический вклад; ΔG_{pe} – полиэлектролитный вклад; ΔG_{entr} – энергетический эффект изменения трансляционных ΔG_{tr}, ротационных ΔG_{rot} и вибрационных ΔG_{vibr} степеней свободы:

$$\Delta G_{entr} = \Delta G_{tr} + \Delta G_{rot} + \Delta G_{vibr}, \qquad (2)$$

$$\Delta G_{hyd} = \square \cdot \Delta A \ \square\ \gamma = 50\ kal/(\text{mol} \cdot \text{Å}2), \qquad (3)$$

где γ – микроскопический коэффициент поверхностного натяжения (γ = 50 кал/(моль·Å2).

Для определения константы связывания БЭ с ДНК было использовано следующее уравнение:

$$K = \exp\left(-\frac{\Delta G_{total}}{RT}\right), \qquad (4)$$

где ΔG_{total} – тотальная энергия взаимодействия, R – газовая постоянная, T – абсолютная температура, K – константа связывания.

Результаты и обсуждение. Для проведения симуляции взаимодействия БЭ с ДНК и выявления возможных сайтов связывания был использован метод “слепой способ”, описывающий энергетически выгодные точки возможного взаимодействия [16, 17]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что число мест связывания на 26 пар равно 9. Это означает, что одна молекула БЭ в среднем приходится на 2.9 пар оснований. Были рассчитаны параметры конкретных сайтов связывания и процесса интеркаляции. Причем пространственная ориентация БЭ осуществлялась при 0^0 и при 180^0 относительно плоскости пар оснований.

В результате симуляции были получены пространственные и энергетические параметры процесса интеркаляции. Как предполагалось, молекула БЭ была встроена в плоскость между парами оснований, при этом дистанция между парами изменялась (параметры приведены в табл. 1).

Табл. 1. Пространственные параметры интеркаляции
(r – дистанция, φ – угол взаимодействия, θ – торсионный угол взаимодействия).

Пространственная ориентация БЭ	r (A^0)	$\varphi(^0)$	$\theta(^0)$
$3'$-$5'_{0}{}^{0}$	6.94-6.58	0.02	0.01
$3'$-$5'_{180}{}^{0}$	6.83-6.69	0.03	0.02
Сред.квадр. откл. от оси ДНК $_0{}^0$	0.046	0	0
Сред.квадр. откл. от оси ДНК $_{180}{}^0$	0.050	0	0

Табл. 2. Энергетические параметры интеркаляции

N	Пространственная ориентация БЭ	Взаимодействие, КДж/моль	Межмолекулярные внутри радиуса (SR – короткая дистанция)	Межмолекулярные вне радиуса (LR – длинная дистанция)
1.	0^0	Кулоновские	-40	-
		Ван-дер-Ваальс	-163	- 6.10
2.	180^0	Кулоновские	-47	-
		Ван-дер-Ваальс	-165	-6.12

Из табл. 1 и 2 видно, что при интеркаляции пространственная ориентация молекулы почти не влияет на основные параметры этого процесса.

Используя уравнение (1), была рассчитана тотальная энергия взаимодействия, что составило -6.1 Ккал/моль.

Для выявления параметров взаимодействия важным критерием является и константа связывания лиганда на макромолекуле. С использованием уравнения (4) была получена константа связывания БЭ на молекуле ДНК K = 99.7 · 10^4 M^{-1}, что согласуется с литературными данными [3, 4, 8, 11, 19, 26].

В табл. 3 приведены константы связывания (K) и число пар оснований, с которыми связывается одна молекула лиганда (n), полученные методами абсорбционной спектроскопии [8, 11, 26], флюоресцентой спектроскопии [11, 26], методом магнитного пинцета [19] и результаты, полученные с помощью ММД.

Табл. 3. Сравнительные параметры *K* и *n*, полученные разными методами

N	Параметры	Экспериментально			ММД
		[8, 11, 26]	[11, 26]	[19]	
1.	Константа связывания (K)	112 · 10^4	130 · 10^4	130 · 10^4	99.7 · 10^4
2.	Число пар оснований (n)	≈ 2.4	≈3 .0	≈ 1.9	≈ 2.9

Наряду с вышеперечисленными методами, ММД может использоваться для выявления и расчета типов и параметров связывания как биологически активных природных соединений различной природы, так и лекарственных препаратов с клеточными структурами.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Вардеванян П.О., Карапетян Р. А. и др.,* Конкурентность связывания бромистого этидия и Hoechst 33258 с ДНК// НАНАД, *107*, 2 , с. 193-198, 2007.
2. *Вардеванян П.О., Антонян А.П и др.* Особенности связывания EtBr и HOECHST 33258 с ДНК различного GC-содержания, Биолог. журн. Армении, *61*, 2, с.21-26, 2009.
3. *Вардеванян П.О., Антонян А.П.* Изучение комплексов ДНК с лигандами различной природы, Биол. журн. Арм., *62*, 3, с. 50-58, 2010.
4. *Вардеванян П.О., Карапетян Р. А. и др.* Взаимодействие нековалентно связывающихся лигандов с ДНК, НАНАД, *111*, 4, с. 352-358, 2010.
5. *Карапетян А.Т.,Вардеванян П.О. и др.* Влияние двух способов связывания лигандов на параметры перехода спираль-клубок, Биополимеры и Клетка, *5*, 5, с. 38-43, 1989.
6. *Шноль Э.Э., Гривцов А.Г.* и.др., Метод молекулярной динамики в физической химии, М., Наука, 1996.
7. *Allen M.P., Tildesley D.J.,* Computer Simulation of Liquids, Oxford: Clarendon Press, 2002.
8. *Arakelyan V.B., Sarkisyan G.S. et al.* The analysis of experimental data of DNA EtBr complexes within the rangies of low fillings. Int. conf & DAAD Alumni seminar “Biotechnology and Health-2”, pp 10-15,2008.
9. *Chaires J.B.* Energetics of Drug–DNA Interactions. Biopolymers, 44, p. 201–215, 1997.
10. *Cheng H.-P.* Cluster-surface collisions: Characteristics of Xe55- and C20-Si[111] surface bombardment, J. Chem. Phys., *111*, 16, p. 7583-7592, 1999.
11. *Chitre A.V. , Korgankar K.S.* Binding of Ethidium Bromide and Quinacrine Hydrochloride to Nucleic Acids and Reconstituted Nucleohistones, Biochem. J., *179*, p. 213-219, 1979.
12. *Da Silva S., Vranken A., Laue W.* ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser interface E. Manuscript to be submitted.
13. *Hajduk, S.L.* in Progress in Molecular and Subcellular Biology, Springer-Verlag, *6*, p. 158-200, 1978.
14. *Hess B., Kutzner C., Van der Spoel D., Lindah L.* GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. E. J. Chem. Theory Comput, *4*, p. 435-447, 2008.
15. *Hornak V., Abel R.,et al.* Comparison of Multiple Amber Force Fields and Development of Improved Protein Backbone Parameters PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics 65, p. 712–725, 2006.

16. *http://autodock.scripps.edu/resources/adt.*
17. *http://vina.scripps.edu/.*
18. *Lane A.N., Jenkins T.C.* Thermodynamics of nucleic acids and their interactions with ligands. Quarterly Reviews of Biophysics, *33*, 3, p. 255–306, 2000.
19. *Lipfert J, Klijnhout S, Dekker N.H.* Torsional sensing of small-molecule binding using magnetic tweezers, Nucleic Acids Res., *38*, 20, p.7122-7132, 2010.
20. *Macke T., Svrcek-Seiler W.A. et al*. Generation of Models for "Unusual" DNA and RNA: A Computer Language for Structural Exploration Updated, 2012.
21. *Marvin /Marvin was used for drawing, displaying and characterizing chemical structures, substructures and reactions, Marvin 5.8.0,ChemAxon (http://www.chemaxon.com), 2012.*
22. *Pettersen E., Goddard T., Huang C., et al.* UCSF Chimera-a visualization system for exploratory research and analysis, J. Comput Chem., *25*, 13, p.1605-1612, 2004.
23. *Qi L., Young W. L., Sinnott S. B.* Effect of surface reactivity on the nucleation of hydrocarbon thin ˇlm through molecular-cluster beam deposition. Surf. Sci. *426,* p. 83, 1999.
24. *Stillinger 1999. F.H., Weber Th. A.* Computer simulation of local order in condensed phases of silicon Phys. Rev. B., *31*, 8. p. 5262-5271, 1985.
25. *Vardevanyan P.O., Antonyan A.P.,et al.* Some Aspects of DNA-EtBr Interaction Pequliarities. Advances in Gene Technology: The Genome and Beyond – Structural Biology for Medicine (Proceedings of the 2002 Miami Nature Biotechnology Winter Symposium) The Scientific World, *2*, S2, p.144-145, 2002.
26. *Vardevanyan P .O., Antonyan A .P. et al.* The binding of ethidium bromide with DNA: interaction with single- and double-stranded structures, exp. and mol. medicine, *35,* 6, pp. 527-533, 2003.
27. *Vardevanyan P.O., Antonyan A.P.,et al.,* Complex-formation of Ethidium Bromide with poly[d(A-T)].poly[d(A-T), J. Biomol. Struct. Dyn., *22*, 4, p.465-470, 2005.
28. *Vardevanyan P.O. Karapetyan R.A. et al.* Pequliarities of complex-formation of Ethidium bromide and Hoechst 33258 with DNA under influence of non termal electromagnetic millimeter waves, Biolog. Jour. of Armenia, *64*, 3, p.102-108, 2012.
29. *Wang J., Wolf R., Caldwell J., et al.,* Development and testing of a general AMBER force field. J. of Comput. Chem*.*, *25*, p. 1157-1174, 2004
30. *Wang J., Wang W., Kollman P., Case D.* Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations, J. of Mol. Graph. and Mod., *25*, pp. 247-260, 2006
31. *Waring, M. J.*, Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids, J. Mol. Biol. *13*, p. 269-282, 1965.
32. *Waring, M.J.* DNA modification and cancer,Annu. Rev. Biochem., 50, p. 159-191, 1981.
33. *Wilson, W.D., Jones, R.L.* in Advances in Pharmacology and Chemotherapy, Academic, *18*, p. 117-222, 1981.

Поступила 10.04.2013

Հայաստանի Գիտությունների Ազգային Ակադեմիա
Национальная Академия Наук Армении
National Academy of Sciences of Armenia

Հայաստանի Կենսաբանական Հանդես
Биологический Журнал Армении
Biological Journal of Armenia

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

Биолог. журн. Армении, 3 (65), 2013

СДВИГИ В СОДЕРЖАНИИ ФОСФОЛИПИДОВ ЯДЕР КЛЕТОК ТИМУСА КРЫС ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЦИСПЛАТИНА

А.Г. ОГАНЕСЯН

Ереванский госуниверситет, кафедра биофизики
biology@ysu.am

Изучены изменения содержания общих фосфолипидов и их отдельных фракций ядер клеток тимуса крыс после 24-часового *in vivo* воздействия антиопухолевого препарата цисплатина. Показано, что воздействие цисплатина приводит к достоверному снижению общего содержания фосфолипидов ядер на 20 %. Из семи выявленных фракций фосфолипидов достоверно уменьшается содержание четырех: фосфатидилинозитола, фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина и кардиолипина, в то время как изменения содержания сфингомиелина, фосфатидилсерина и фосфатидовой кислоты не достоверны.

Фосфолипиды – цисплатин – ядра клеток тимуса

Հետազոտվել է առնետների ուրցագեղձի բջջակորիզների ընդհանուր ֆոսֆոլիպիդների և նրանց առանձին ֆրակցիաների բաղադրությունը հակաուռուցքային միացության՝ ցիսպլատինի 24-ժամյա *in vivo* ազդեցության ժամանակ: Ցույց է տրվել, որ ցիսպլատինը բերում է ֆոսֆոլիպիդների ընդհանուր բաղադրության 20%-ով հավաստի նվազման: Ընդ որում, ֆոսֆոլիպիդների յոթ ֆրակցիաներից չորսի՝ ֆոսֆատիդիլինոզիտոլի, ֆոսֆատիդիլխոլինի, ֆոսֆատիդիլէթանոլամինի և կարդիոլիպինի բաղադրությունը հավաստիորեն նվազում է, իսկ սֆինգոմիելինի, ֆոսֆա-տիդիլսերինի և ֆոսֆատիդային թթվի քանակության փոփոխությունները հավաստի չեն:

Ֆոսֆոլիպիդներ – ցիսպլատին – ուրցագեղձի բջջակորիզներ

The content of total phospholipids and their individual fractions in rat thymus nuclei was studied. The *in vivo* action of antitumor agent cisplatin leads to decrease in total phospholipid content by 20%. The quantities of four phospholipid fractions (phosphatidylinositol, phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and cardiolipin) are reliably decreased while the changes in content of sphingomielin, phosphatidylserine and phosphatidic acid are not reliable.

Phospholipids – cisplatin – thymus cells nuclei

Известно, что платиновые соединения представляют важный класс антиопухолевых препаратов. В частности, цисплатин (cis-диаминдихлорплатин (II)) широко применяется в химиотерапии раковых заболеваний различной этиологии [6, 9, 13]. Первичной мишенью воздействия цисплатина является клеточное ядро, в особенности ДНК малигнизированных клеток, однако известно также, что повреждения наблюдаются не только в раковых, но и в нормально функционирующих клет-ках [5, 8]. Они затрагивают метаболические процессы, протекающие в ядрах,
как в ядерных мембранах, так и во внутриядерных структурах, с участием различных компонентов ядра, в частности липидов [10, 11].

В настоящей статье приводятся результаты опытов по изучению изменений содержания и состава фосфолипидов ядерной фракции клеток тимуса крыс после *in vivo* воздействия цисплатина.

Материал и методика. Эксперименты проводились на беспородных крысах массой 120-150г. Цисплатин вводили внутрибрюшинно в концентрации 5 мг на 1000 г массы животного. Крыс декапитировали через 24 ч после введения препарата. Ядра клеток тимуса выделяли по методу Блобела и Потера [4]. Экстракцию фосфолипидов проводили по методу Блая и Дайера [3]. Фракционирование фосфолипидов проводили методом тонкослойной хроматографии на пластинках силикагеля L площадью 6x9 см^2, толщиной 5-7мм, с использованием разделительной смеси хлороформ-метанол-вода в соотношении 65:24:4. После хроматографии пластинки сушили при 20^{0}C и обрабатывали раствором 15,6%-ного $CuSO_4$ в 8%-ной фосфорной кислоте. Затем пластинки 15 мин держали при температуре 189^{0}C. Количественное определение отдельных фракций фосфолипидов проводили денситометрированием компьютерной программой FUGIFILM Science Lab 2001 Image Gauge V 4.0. Полученные результаты обрабатывали статистически.

Результаты и обсуждение. В состав липидов ядер, помимо липидов – ядерных мембран, входят также липиды внутриядерных структур – хроматина и ядерного матрикса, играющих важную роль в основных функциях ядра. Содержание и состав липидов ядер, в том числе фосфолипидов (и в особенности фосфолипидов, связанных с ДНК, с хроматином и с ядерным матриксом) в опухолевых клетках значительно отличаются от таковых нормальных клеток [2, 12]. Изучение влияния антиопухолевых препаратов на липидный состав ядер может иметь важное значение в выявлении специфических сдвигов в липидном метаболизме при малигнизации.

Опыты показали, что цисплатин заметно снижает количество общего фосфолипида через 24 ч после *in vivo* воздействия (рис.1), что свидетельствует о его подавляющем метаболизм липидов воздействии в ядрах клеток тимуса. Содержание общего фосфолипида уменьшается на 20% (рис.1).

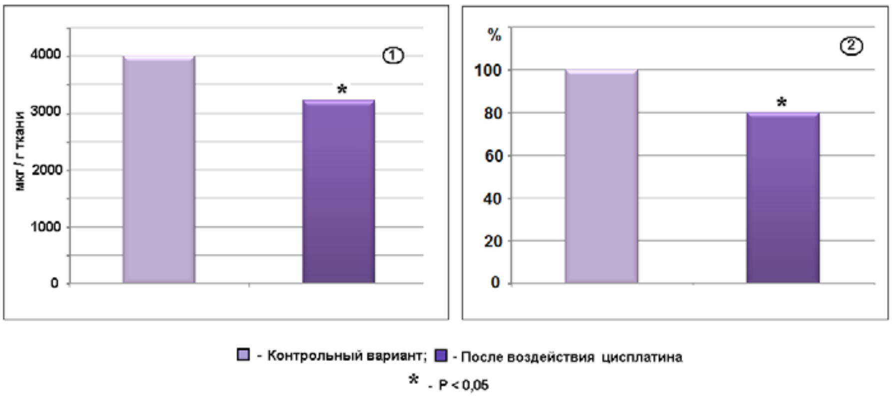


Рис.1. Количество общего фосфолипида в мкг/г ткани (1) и в процентах (2) в контроле и после воздействия цисплатина

Фракционирование выявило семь фракций фосфолипидов, из которых содержание фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина составляют более 50% общего количества фосфолипидов ядер (табл.1). После воздействия цисплатина достоверно изменяется относительное количество и процентное содержание двух холинсодержащих фракций – фосфатидилхолина и сфингомиелина, при этом доля фосфатидилхолина уменьшается (34,6% в контроле и 30,1% после воздействия цисплатина), а сфингомиелина, наоборот, повышается (8,6% и 10,9% соответственно) (табл.1).

Табл. 1. Относительное количество и процентное содержание отдельных фракций фосфолипидов ядер клеток тимуса крыс до и после воздействия цисплатина

#	Фосфолипиды	Контроль		Цисплатин	
		Количество, мкг	%	Количество, мкг	%
1	Фосфатидилсерин	3,00±0,19	6,0	3,65±0,40	7,3
2	Сфингомиелин	4,30±0,75	8,6	*5,45±0,50	10,9
3	Фосфатидилинозитол	3,50±0,30	7,0	3,50±0,50	7,0
4	Фосфатидилхолин	17,30±0,90	34,6	*15,05±0,60	30,1
5	Фосфатидилэтаноламин	11,30±0,50	22,6	11,00±0,40	22,0
6	Кардиолипин	3,40±0,12	6,8	3,50±0,20	7,0
7	Фосфатидовая кислота	7,20±0,70	14,4	7,85±0,90	15,7
	Сумма	50,00	100	50,00	100

*p<0.05

При определении абсолютного количества отдельных фосфолипидов наблюдаются достоверные сдвиги в четырех фракциях (табл.2). Наибольшие изменения содержания выявляются во фракциях фосфатидилхолина (уменьшение на 30%), в то время как уменьшение содержания фосфатидилэтаноламина, фосфатидилинозитола и кардиолипина соответствует уменьшению количества общего фосфолипида ядер (уменьшение на 20%). Изменения абсолютного содержания сфингомиелина, фосфатидилсерина и фосфатидовой кислоты не достоверны (табл.2).

Табл. 2. Абсолютное количество (в мкг/г ткани) отдельных фракций фосфолипидов ядер клеток тимуса крыс в контроле и после воздействия цисплатина

#	Фосфолипиды	Контроль	Цисплатин
		Количество, мкг	Количество, мкг
1	Фосфатидилсерин	240,0 ± 22,0	233,6 ± 25,6
2	Сфингомиелин	344,0 ± 30,0	348,8 ± 32,0
3	Фосфатидилинозитол	280,0 ± 14,0	*224,0 ± 11,9
4	Фосфатидилхолин	1384,0 ± 42,0	*963,2 ± 38,4
5	Фосфатидилэтаноламин	904,0 ± 40,0	*704,0 ± 25,6
6	Кардиолипин	272,0 ± 20,6	*224,0 ± 12,8
7	Фосфатидовая кислота	576,0 ± 56,0	502,4 ± 57,5
	Сумма	4000,0	3200,0

*p<0.05

Из этих сдвигов особого внимания заслуживает разнонаправленное изменение относительного содержания (доли) фосфатидилхолина и сфингомиелина (табл. 1), так как известно, что метаболические пути их синтеза пересекаются [2]. Заключительным этапом синтеза фосфатидилхолина является перенос фосфорилхолина на молекулу диацилглицерида, а при синтезе сфингомиелина – перенос того же фосфорилхолина на молекулу церамида [1]. Имеются данные, что в опухолевых клетках наблюдается гиперактивация фермента холинкиназы, ответственного за формирование фосфорилхолина, что способствует усилению метаболизма липидов при канцерогенезе. Показано также, что противоопухолевые, цитостатические препараты, в том числе цисплатин, ингибируют активность холинкиназы [1,7], тем самым подавляя формирование фосфорилхолина. Это может способствовать уменьшению содержания фосфатидилхолина, выявленному в наших экспериментах (табл. 2). Примечательно, что абсолютное содержание сфингомиелина практически не изменяется, а некоторое повышение доли сфингомиелина, видимо, является результатом более резкого подавления синтеза других фосфолипидных фракций, в особенности того же фосфатидилхолина.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Albi E., Cataldi S., Rossi G., Viola Magni M.* A possible role of cholesterol-sphingomyelin/phosphatidylcholine in nuclear matrix during rat liver regeneration. J. Hepatol., *38*, 623–628, 2003.
2. *Albi E., Lazzarini R.,Viola Magni M.* Phosphtidylcholine/sphingomyelin metabolism crosstalk inside the nucleus. Biocem. J., *410,* 1-31, 2008.
3. *Bligh E.G., Dyer W.J.,* A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Biochem. Physiol., *37*, 911-917, 1959.
4. *Blobel G., Potter V.R.* Nuclei from rat liver: Isolation method that combines purity with high yield. Science, *154*, 76-79, 1966.
5. *Boulikas T., Vougiouka M.* Cisplatin and platinum drugs at the molecular level (review). Oncology reports, *10*, 1663-1682, 2003.
6. *Florea A.-M., Busselberg D.* Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. Cancers, *3*, 1351-1371, 2011.
7. *Gault C.R., Obeid L.M., Hannun Y.A.* An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown. Adv.Exp.Med.Biol., *688*, 1-23, 2010.
8. *Gonzalez V.M., Fuertes M.A., Alonso S., Perez J.M.* Is cisplatin-induced cell death always prodeced by apoptosis? Molecular Pharmacology, *59*, 657-663, 2001.
9. *Miller R.P., Tadagavadi R.K., Remesh G., Reeves W.B.* Mechanism of cisplatin nephrotoxicity. Toxins, *2*, 2490-2518, 2010.
10. *Speelmans G., Sips W.H.H.M., Grisel R.J.H., Staffhorst R.W.M., Fichtinger-Schepman A.M.J., Reedijk J., de Kruijff B.* The interaction of the anti-cancer drug cisplatin with phospholipids is specific for negatively charged phospholipids and takes place at low chloride ion concentration. Biochimica et Biophysica Acta, 1283, 60-66, 1996.
11. *Speelmans G., Staffhorst R.W.M., Versluis K., Reedijk J., de Kruijff B.* Cisplatin complexes with phosphatidylserine in membranes.Biochemistry, *36*, 10545-10550, 1997.
12. *Struchkov V.A., Strazhevskaya N.B.* Structural and functional aspects of nuclear lipids in normal and tumor cells. Biochemistry (Moscow), *65*, 5, 620-643, 2000.
13. *Xin Y., Panichpisal K., Kurtzman N., Nugent K.* Cisplatin nephrotoxicity: a review. Am. J. Med. Sci., *334*, 2, 115-124, 2007.

Поступила 03.04.2013

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

Биолог. журн. Армении, 3 (65), 2013

ВЛИЯНИЕ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ОРНИТИНОВОГО ЦИКЛА У ПЛЕСНЕВЫХ ГРИБОВ *ASPERGILLUS NIGER* R-3

Р.М. ДАВТЯН, С.П. ОГАНЕСЯН, А.М. КАРАПЕТЯН, М.А. ДАВТЯН

Ереванский госуниверситет, кафедра биохимии
bio_chm@ysu.am

Изучалось влияние перекиси водорода на активность ферментов орнитинового цикла у плесневых грибов *Aspergillus niger* R-3. Показано, что при выращивании плесневых грибов на питательной среде, содержащей H_2O_2 в концентрации 0.016 М, резко стимулируются ферменты орнитинового цикла (карбамоилфосфатсинтетаза I, орнитинтранскарбамоилаза, аргининосукцинатсинтетаза, аргининосукцинатлиаза, аргиназа).

Аргиназа – карбамоилфосфат синтетаза I – орнитинтранскарбамоилаза – аргининосукцинатсинтетаза – аргининосукцинатлиаза

Ուսումնասիրվել է ջրածնի պերօքսիդի ազդեցությունը *Aspergillus* niger R-3 բորբոսասնկերի օրնիտինային ցիկլի ֆերմենտների ակտիվության վրա: Ցույց է տրվել, որ 0.016 Մ կոնցենտրացիայով ջրածնի պերօքսիդ պարունակող սննդամիջավայրում աճեցված բորբոսասնկերի էքստրակտներում զգալի խթանվում են օրնիտինային ցիկլի բոլոր 5 ֆերմենտները (կարբամոիլֆոսֆատ սինթետազ I, օրինիտինտրանսակարբամիլազ, արգինինոսուկցինատսինթետազ, արգինինոսուկցիանազ, արգինազ):

Արգինազ – կարբամոիլֆոսֆատ սինթետազ I – օրինիտինտրանսակարբամիլազ – արգինինոսուկցինատսինթետազ – արգինինոսուկցիանազ

We studied the influence of hydrogen peroxide on the activity of urea cycle enzymes in *Asp. niger* R-3 yeasts. It has been shown that the enzymes of urea cycle are stimulated (carbamoyl phosphate synthetase I, ornitine transcabamoylase, argininosuccinate synthetase, argininosuccinase, arginase) when the yeast grow in a medium containing 0.016 M H_2O_2.

Carbamoyl phosphate synthetase I – ornitine transcabamoylase – argininosuccinate synthetase – argininosuccinase – arginase

Установлено, что перекись водорода в высоких концентрациях (0.1-2.2 ммоль) разрушает клеточные структуры, разрушает цепи ДНК [7, 18-20, 22], резко снижает содержание нуклеозидтрифосфатов, что приводит к смерти [12], подавляет гликолиз [22]. А при низких концентрациях (0.1-50.0 мкмоль), наоборот, стимулирует многие клеточные процессы. В частности, H_2O_2 активирует K^+ каналы плазматической мембраны [9-11], стимулирует циклооксигеназный путь биосинтеза простагландинов [13], участвует в биосинтезе тиреоидных гормонов [4, 5], активирует различные фосфолипазы [6, 14], стимулирует активность тирозин протеинкиназы [8, 21].

Доказано, что H_2O_2 в высоких концентрациях (10^{-2}–10^{-5} М) подавляет рост дрожжей *Sachar. cerevisiae*, а при низких (10^{-7} М), наоборот, стимулирует их рост [3]. Нашими предыдущими исследованиями показано, что H_2O_2, добавленная к инкубируемому экстракту плесневых грибов *Aspergillus niger* R-3 при концентрации 0.018 М, резко стимулирует активность L-аминокислотной оксидазы. Нужно отметить, что исследуемые грибы в ходе проявления ферментативной активности вырабатывают перекись водорода. Было бы интересно исследовать влияние H_2O_2 на активность ферментов, не вырабатывающих H_2O_2. Перед нами была поставлена задача исследовать влияние H_2O_2 (при концентрации 0.018 М) на активность ферментов орнитинового цикла важнейшего механизма нейтрализации токсического аммиака у уреотелических организмов. Известно, что орнитиновый цикл мочевинообразования открыт Кребсом и Гензелайтом еще в 30-е годы прошлого века. Цикл состоит из 5 ферментов, которые вовлекают аммиак в биосинтез мочевины. Первым ферментом цикла является аммиакзависимая карбамоилфосфатсинтетаза I, второй фермент – орнитинтранскарбамоилаза, катализирующая синтез цитруллина из орнитина и карбамоилфосфата, третий фермент – аргининосукцинатсинтетаза, катализирующая конденсацию цитруллина с аспартатом, в результате чего синтезируется аргининосукцинат. Четвертый фермент – аргининосукцинатлиаза катализирует гидролиз аргининосукцината с образованием аргинина и фумаровой кислоты и пятый фермент – аргиназа, гидролизирующая аргинин на мочевину и орнитин.

Материал и методика. В качестве объекта исследований служил плесневой гриб *Asp. niger* R-3, который используется в производстве лимонной кислоты. Гриб выращивается в синтетической питательной среде Ролена следующего состава: глюкоза – 2 г., KH_2PO_4 – 0.05 г., $MgSO_4{\cdot}7H_2O$ – 0.05г., – $ZnSO_4{\cdot}7H_2O$-0.005 г, растворенных в 100 мл водопроводной воды. В среду роста добавляли также 0.5 мл 33%-ной H_2O_2. В качестве источника азота использовали L-аланин – 0.4 г. Посев производилися в 100 мл среде (pH-7.2, 42°C), выращивание – при 32°C. Четырехдневная выращенная культура *Asp. niger* R-3 подвергалась гомогенизации в дистиллированной воде в гомогенизаторе типа Поттера-Эллведжиема (6 мин).

В первую очередь мы определяли влияние перекиси водорода на активность ферментов карбамоилфосфатсинтетазы и орнитинтранскарбамоилазы, которые катализируют биосинтез цитруллина из аммиака, углекислого газа и орнитина. Активность указанных ферментов определяли по Браунштейну и сотр. [1]. Клетки разрушали в изотоническом растворе KCl. В опытную пробу вносили: 0.5 мл 5%-ного гомогената, АТФ-10мкм, $MgSO_4$ – 35 мкМ, L-орнитин – 20 мкМ, L-глу – 60 мкМ, NH_4Cl – 35 мкМ, NaHCO3 – 30 мкМ и KCl до изотонической концентрации среды. Все растворы готовили в 0.05 М K-фосфатном буфере, pH 7.2. Общий объем смеси составил 3.5 мл. Инкубация проводилась при 37°C в течение одного часа. Реакцию останавливали добавлением 1 мл 20 % ТХУ. Пробы центрифугировали и в надосадочной жидкости определяли цитруллин.

Цитруллин определяли колориметрическим методом Арчибальда [2]. В пробирку наливали 1 мл надосадочной жидкости, 2,5 мл кислотной смеси (1 часть концентрированной фосфорной кислоты и 3 части концентрированной серной кислоты в присутствии водных растворов солей $FeCl_3$, $MgSO_4$) и 0.25 мл 3%-ного раствора диацетилмонооксима. Пробирки встряхивали, кипятили в темноте в течение 45 мин. Пробы охлаждали в течение 10 мин и колориметрировали на СФ-4 при длине волны 478 ммк против контроля на реактивы.

В качестве дополнительного метода определения биосинтеза цитруллина проводили арсенолиз цитруллина, который катализируется орнитинтранскарбамоилазой [17]. В пробирку наливали 0.5 мл гомогената, приготовленного на воде, и 1.5 мл раствора, содержащего 100 мкМ L-цитруллина и 500 мкМ мышьяковокислого натрия, нейтрализованного до pH 6.8-7.1. Инкубацию проводили при 37°C в течение одного часа. Реакцию останавливали добавлением 0.5 мл 15 % ТХУ. Аммиак определяли микродиффузионном методом.

Аргининосукцинатсинтетазную и аргининосукциназную активность определяли методом Ратнер и Паппас [16]. Гомогенат готовили в 0.05 М калий-фосфатном буфере, pH 7.2.

В опытную пробу вносили: 0.05 мл 5% гомогената АТФ – 10мМ, $MgSO_4$ – 10 мкМ, L-цитруллина – 20 мкМ, янтарной кислоты – 20 мкМ, L-аспартата – 20 мкМ, 20 ед. аргиназы. Общий объем смеси составлял 3.9 мл. Инкубацию проводили при 37°С в течение одного часа. Определение образовавшейся при этом мочевины проводили методом Арчибальда [2].

Аргиназную активность определяли методом Ратнер с небольшими изменениями [15]. К 1 мл исследуемого экстракта плесневых грибов добавляли 5 мкМ $MnCl_2$ (в 0.2 мл воды), 1.4 мл 0.04 М глицинового буфера (рН-9.5) и 50 мкМ L-аргинина (в 0.4 мл глицинового буфера). После 1-часовой инкубации реакцию приостанавливали добавлением 1 мл 15% ТХУ, спустя 20 мин центрифугировали и в надосадочной жидкости определяли мочевину. Активность фермента выражали в микромолях образовавшейся мочевины на 1 г мицелия.

Результаты и обсуждение. В первой серии исследований мы изучали биосинтез цитруллина в экстрактах плесневых грибов, выращенных на среде, содержащей 0.016 М H_2O_2. Соответствующие данные приведены в табл. 1. Как видно из данных табл. 1, при инкубировании экстракта грибов в присутствии указанных в методической части субстратов проявляется активность карбамоилфосфатсинтетазы и орнитинтранскарбамилазы, а именно при часовой инкубации экстракта синтезируется 1,1 мкмоль цитруллина на 1 г мицелия, в то время как при инкубации экстрактов грибов, выращенных в присутствии H_2O_2, резко стимулируются вышеуказанные ферменты (в 4.3 раза), и образовавщийся цитруллин составляет 4,8 мкмоль на 1 г мицелия. В качестве дополнительного метода определения орнитинтранскарбамилазной активности проводили арсенолиз цитруллина. Как показывают полученные данные, при высоких концентрациях мышьяковокислого натрия (500 мкМ) из цитруллина образуется аммиак, количество которого составляет 9,1 мкмоль на 1 г мицелия, а под влиянием H_2O_2 арсенолиз активируется в 3,6 раза.

Табл. 1. Влияние перекиси водорода на активность ферментов карбамолифосфатсинтетазы и орнитинтранскарбамоилазы у плесневых грибов *Aspergillus niger* R-3 ($n=5$, $p<0.05$)

Питательная среда Ролена	Карбамолифосфатсинтетаза и орнитинтранскарбамоилаза (мкМ цитруллин на 1 г мицелия)	Арсенолиз цитрулина (мкМ NH_3 на 1 г мицелия)
Без H_2O_2	1,1±0.001	9,1 ±0.001
0.016 М H_2O_2	4,8±0.001	32,9 ± 0.015

Таким образом, помимо L-аминокислотной оксидазы, резко стимулируется активность карбамолифосфатсинтетазы и орнитинтранскарбамоилазы. Данные табл. 2 показывают, что H_2O_2 стимулирует также аргининосукцинатсинтетазную и аргининосукциназную активность экстрактов в 3.7 раза.

В следующей серии экспериментов исследовали влияние H_2O_2 на активность аргиназы плесневых грибов. Данные табл. 3 показывают, что аргиназная активность резко стимулируется в присутствии H_2O_2 в питательной среде роста дрожжей. Так, без H_2O_2 аргиназная активность составляет 193.2 мкМ мочевины на 1 г мицелия, а в присутствии H_2O_2 – 907.5 мкМ мочевины на 1 г мицелия.

Обобщая приведенные данные, можем заключить, что H_2O_2 стимулирует все ферменты орнитинового цикла у плесневых грибов *Aspergillus niger* R-3. Причем степень стимуляции в отношении различных ферментов различна. Очевидный интерес представляет тот факт, что стимулируются перекисью водорода не только H_2O_2, вырабатывающие ферменты (оксидаза L-аминокислот), но и ферменты, не вырабатывающие H_2O_2.

Табл. 2. Влияние перекиси водорода на активность ферментов аргининосукцинатсинтетазы и аргининосукциназы у плесневых грибов *Aspergillus niger* R-3 (n=5, p<0.05)

Питательная среда Ролена	Аргининосукцинатсинтетаза и аргининосукциназа, мкМ мочевины на1 г мицелия
Без H_2O_2	8.67±0.001
0.016 М H_2O_2	32.1±0.0015

Табл. 3. Влияние перекиси водорода на активность аргиназы у плесневых грибов *Aspergillus niger* R-3 (n=5, p<0.05)

Питательная среда	Аргиназная активность, мкМ мочевина на1 г мицелия
Без H_2O_2	193.2±0.06
0.016 М H_2O_2	907.5±0.08

ЛИТЕРАТУРА

1. *Браунштейн А.Е., Северина И.С., Барская Ю.Е.* О торможении орнитинового цикла мочевинообразования-метил-DL-аспарагиновой кислотой. Биохимия, *21*, с.738-745, 1956.
2. *Archibald R.M.* Determination of citrulline and allantoin and dfemonstration of citrulline in blood plasma. J. Biol. Chem., *156*, p 121-142, 1944.
3. *Bagdasaryan N.S., Ayrapetyan S. N.*. The effect of SMF, EHPP and Hydrogen peroxide on the development of yeasts. In: Bioelectromagnetics: Current Concepts, S. Ayrapetyan and M. Markov, eds., NATO Science Series, Springer Press, the Netherlands,. pp. 391-396, 2006
4. *Deme D., Doussiere J., De Sandro., V., Dupuy C., Pommier J., Virion A.,* The Ca^{2+}/NADFH-dependent H_2O_2 generator in thyroid plasma membrane: inhibition by diphenyleneoonium. Biochem J., *301*, p 74-81, 1994
5. *Dupuy C., Virion A., Ohayon R., Kaniewski J., Deme D., Pommier J.* Mechanism of hydrogen peroxide formation catalyzed by NADPH oxidase in thyroid plasma membrane. J. Biol. Chem., *266*, p. 3739-3743, 1991.
6. *Goldman R., Ferber E., Zort U.* Reactive oxygen species are involved in the activation of cellular phospholipase A2. FEBS Lett.. 309, p. 190-192, 1992.
7. *Harian J.M., Levine J.D., Callahan K.S., Schwartz B. R., Harker L.A.,* Glutathion redox cycle protects culturedendothelial cells against lysisi by extracellular generated hydrogen peroxide. J. Clin. Invest., *73*, p. 706-713, 1984.
8. *Heffetz D., Rutter W.J., Zick Y.* The insulinomimetic agents H_2O_2, and vanadte stimulate tyrosine phosphorylation of potential target proteins for the insulin receptor kinase in intact cells. Biochem J., *288,* p. 631-635, 1992.
9. *Krippeit Drews P., Haberland C., Fingerle J., Drews G., Lang F.* Effects of H_2O_2 on membrane potential and $[Ca^{2+}]$: of cultured rat arterial smooth muscle cells. Biochem. Biophys. Res. Commun., *209*, p. 139-145, 1995.
10. *Krippeit Drews P., Lang F., Haussinger D.,* Drews H_2O_2, induced hyperpolarization of pancreatic B-cells. Pflungers Arch., *426*, p. 552- 554, 1994.
11. *Kuo S. S., Saad A. H., Koong A. C., Hahn G. M., Giaccia A. J.,* Potassium-channel activation in response to low doses of Y-irradiation involves reactive oxygen intermediates in nonexcitatory cells. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., *90*, p. 908-912, 1993.
12. *O'Donnell-Tormey J., De Boer C. J., Nathan C.F.* Resistance of human tumor ceiis in vitro to oxidative cytolysis. J. Clin Invest., *76*, p. 80-86, 1985.
13. *Pratico D., Juliano L., Puicinelle F.M., Bonavita M.S., Gazzaniga P.P., Violi F.,* Hydrogen peroxide as trigger of platelet aggregation. Haemostasis, 21, p. 169-174, 1991.

14. *Rao G.N., Runge M.S., Alexander R.W.* Hydrogen peroxide activation of cytosolie phospholipase A_2 in vascular smooth muscle cells. Biochem. biophys. acta., *1265*, p. 67-72, 1995.
15. *Rathner S.,Morell H., Caravalho E.,* Enzymes of arginine metabolism in brain. Arch Biochem. Biophys., *91*, p. 280-286, 1949.
16. *Ratner S., Pappas A. Biosynthesisi of urea. I.* Enzymic mechanism of arginine synthesisi from citrulline. J. Biol. Chem., *179,* 9, p. 1183-1198, 1949.
17. *Reichard P.* Ornithine carbamyl transferase from rat liver. Acta Chem. Scand. II 523, 1957.
18. *Schraufstatter I.U., Hinshaw D.B., Hystop P.A., Spragg R.G., Cochrane C.G.* Oxidant injury of cells. DNA strand-breaks activate polyadenosin diphosphosphate-ribose polymerase and lead to depletion of nicotinamide adenine dinucleotide. J. Clin. Invest., 77, p. 1312-1320, 1986a.
19. *Schraufstatter I.U., Hinshaw D.B., Hystop P.A., Spragg R.G., Sklar L.A., Cochrane C.G.,* Hydrogen peroxideinducecl injury of cells and its prevention by inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 83, p. 4908-4912, 1986b.
20. *Schraufstatter Hystop P. A., Jacson J., Cochrane C.C.* Mechanisms of oxidant injury of cells. Leukocyte emigration and its sequelae. Basel: Karger, p. 150-160, 1987.
21. *Shasby D. M., Yorek M., Shasby S.S.,* Exogenous oxidants initiate hydrolysis of endothelial cell inositol phospholipids. Blood., *72*, p. 491-499, 1988.
22. *Spragg R.J., Hinshaw D.B.; Hyslop P.A., Schraufstatter I. U., Cochrane C.G.* Alteration in ATP and energy degree in cultured endothelial and P388D1 cells following oxidant injury. J. Clin. Invest., *76*, p. 1471-1476, 1985.

Поступила 09.04.2013

Հայաստանի Գիտությունների Ազգային Ակադեմիա
Национальная Академия Наук Армении
National Academy of Sciences of Armenia

Հայաստանի Կենսաբանական Հանդես
Биологический Журнал Армении
Biological Journal of Armenia

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

Biolog. Journal of Armenia, 3 (65), 2013

HEAVY METAL ACCUMULATION AND THE EXPRESSION OF THE *copA* AND *nikA* GENES IN *Bacillus subtilis* AG4 ISOLATED FROM THE SOTK GOLD MINE IN ARMENIA

A.A. MARGARYAN[1,2], H.H. PANOSYAN[1], N.-K. BIRKELAND[2], A.H. TRCHOUNIAN[1]

[1]Department of Microbiology, Plants and Microbes Biotechnology, Faculty of Biology, Yerevan State University, 0025 Yerevan, Armenia
[2]Department of Biology, University of Bergen, NO-5020 Bergen, Norway
arminemargaryan@ysu.am

The growth response, heavy metal bioaccumulation ability and the expression of the *copA*, *nikA* and *czcD* genes in the presence of different concentrations of a combination of Cu(II), Ni(II), Zn(II) and Cd(II) metals of *Bacillus subtilis* AG4 isolated from the Sotk Gold Mine (Armenia) have been studied. Minimal inhibitory concentrations of Cu(II), Ni(II), Zn(II) and Cd(II) metals were 3.5 mM, 4.5 mM, 1 mM and 0.5 mM respectively. The concentrations of metal ions in the medium up to 16 µM Cu(II), 17 µM Ni(II), 10 µM Cd(II) and 15 µM Zn(II) were found not to affect bacterial growth. It was shown that *B. subtilis* AG4 accumulated Cu(II) and Zn(II) to 6.8 and 3.0 mg/g wet weight of biomass, respectively. The *nikA* and *copA* genes (but not *czcD*) were identified by PCR amplification using specific primer sets. The highest expression of the *nikA* and *copA* genes was observed at 16 µM Cu(II), 17 µM Ni(II), 10 µM Cd(II) and 15 µM Zn(II) by using RT-qPCR. The expression of the *nikA* and *copA* was inhibited at higher metal ion concentrations.

Heavy metal resistance – metal accumulation – RT-qPCR – nikA – copA – czcD

Ուսումնասիրվել է Սոթքի ոսկու հանքից (Հայաստան) մեկուսացված *Bacillus subtilis* AG4 շտամի աճը, մետաղները կենսակուտակելու ունակությունը, ինչպես նաև *copA, nikA* և *czcD* գեների էքսպրեսիան միջավայրում Cu(II), Ni(II), Zn(II) և Cd(II) տարբեր կոնցենտրացիաների համակցությունների պայմաններում: Cu(II), Ni(II), Zn(II) և Cd(II) մետաղների աճն արգելակող նվազագույն կոնցենտրացիաները կազմել են համապատասխանաբար 3,5 մՄ, 4,5 մՄ, 1,0 մՄ և 0,5 մՄ: Սննդամիջավայրում 16 մկՄ Cu(II), 17 մկՄ Ni(II), 10 մկՄ Cd(II) և 15 մկՄ Zn(II) կոնցենտրացիաների համակցությունը բակտերիայի աճի վրա էական ազդեցություն չի թողնում: Cu(II) և Zn(II) կենսակուտակումը կազմել է *B. subtilis* AG4-ի բջիջների խոնավ քաշում 6.8 մգ/գ և 3.0 մգ/գ համապատասխանաբար: Հատուկ փրայմերներով ՊՇՌ ամպլիֆիկացմամբ ցույց է տրվել *nikA* և *copA* (բայց ոչ czcD) գեների քրոմոսոմային տեղաբաշխվածությունը: RT-qPCR մեթոդով հաստատվել է *nikA* և *copA* գեների առավելագույն էքսպրեսիան սննդամիջավայրում 16 մկՄ Cu(II), 17 մկՄ Ni(II), 10 մկՄ Cd(II) և 15 մկՄ Zn(II) կոնցենտրացիաների պայմաններում: Մետաղների իոնների առավել բարձր կոնցենտրացիաների դեպքում դիտվել է նշված գեների էքսպրեսիայի արգելակում:

Մետաղակայունություն – մետաղների կենսակուտակում – RT-qPCR – nikA – copA –czcD

Изучены рост, биоаккумулирующая способность, а также экспрессия генов *copA*, *nikA* и *czcD* штамма *Bacillus subtilis* AG4, изолированного из Сотского месторождения золота (Армения), при различных концентрациях комплекса металлов Cu(II), Ni(II), Zn(II) и Cd(II) в питательной среде. Минимальная ингибирующая концентрация металлов Cu(II), Ni(II), Zn(II) и Cd(II) составляла 3.5 мМ, 4.5 мМ, 1.0 мМ и 0.5 мМ, соответственно. Концент-рации металлов в среде до 16 мкМ Cu (II), 17 мкМ Ni (II), 10 мкМ Cd (II) и 15 мкМ Zn (II) не оказывали существенного влияния на бактериальный рост. Установлена био-аккумулирующая способность штама *B. subtilis* AG4, которая составляла для Cu(II) 6.8 мг/г сырого веса биомассы, а для Zn(II) – 3.0 мг/г.

Расположение генов *nikA* и *copA*, но не гена *czcD* на хромосоме показано с помощью ПЦР-амплификации с использованием специфичных праймеров. С помощью ОТ-ПЦР в реальном времени показана высокая экспрессия генов *nikA* и *copA* при 16 мкМ Cu(II), 17 мкМ Ni(II), 10 мкМ Cd(II) и 15 мкМ Zn(II) концентрациях. Экспрессия генов *nikA* и *copA* ингибировалась при более высоких концентрациях ионов металлов.

Устойчивость к тяжелым металлам – ОТ-ПЦР в реальном времени – nikA – copA – czcD

Heavy metals such as Cu, Ni, Zn and Cd are required by bacteria in trace amounts as enzyme cofactors and as structural components of proteins [13]. In some environments, such as mines and ores, the metal ions are exceeding the usual lethal limit for organisms. However, some highly adapted bacteria have evolved metal resistance systems to enable them to grow at otherwise lethal concentrations of heavy metals [13, 14]. Metal resistance genes are located on plasmids, chromosomes or transposons, but there are differences between chromosomal and plasmid metal resistance systems. Some heavy metal resistance systems are usually chromosomal-based and more complex than plasmid systems, which are usually toxic-ion efflux pumps [1].

The main processes for regulating the intracellular concentrations of inorganic cations and anions are membrane transport systems [1, 14]. Under certain condition, metal ions can be accumulated by uptake systems with high substrate specificity [6, 13, 15]. Thus, Ni is taken up by prokaryotic cells by high-affinity ABC-type of ion transporting multi component system consisting of five protein subunits; NikA-E [5, 10].

Excessive intracellular concentration of metal ions initiates metal resistance by enzymatic detoxification, intracellular sequestration of the metals by protein binding or/and reducing accumulation based on active efflux of toxic ions from the cell [1, 6, 11]. Metal ion efflux could be regulated by specific extrusion pumps of the P-type ATPase family and CDF (cation diffusion facilitator) family of transporters [11, 19]. The Cu(II) homeostasis in *Bacillus subtilis* is regulated by the *copZA* operon, encoding a Cu(II) chaperon, and a Cu(II) efflux P-type ATPase [9, 17, 20], while a CzcD protein of the CDF family protects the bacilli against elevated levels of Zn(II), Cd(II), Co(II) and Ni(II) [8, 11].

Metal resistance mechanisms have been found in different microbial groups [18, 19]. The members of the genus *Bacillus* show high tolerance to heavy metals and possess high metal sorption capacity [23].

The growth response, heavy metal ion accumulation ability and the expression of the *copA, nikA* and *czcD* genes in the presence of different concentrations of a combination of Cu(II), Ni(II), Zn(II) and Cd(II) metals in the medium for *Bacillus subtilis* AG4 isolated from the Sotk Gold Mine (Armenia) are reported in the present work.

***Materials and methods*.**

Bacteria and determination of minimal inhibitory concentration (MIC): The thermophilic bacterium *Bacillus subtilis* strain AG4, was recently isolated from the Sotk Gold Mine (Armenia) [7]. The strain was maintained and grown on medium with the following composition: yeast extract, 5 g/l; peptone, 5 g/l; NaCl, 5 g/l; agar, 15 g/l. Stock solutions of $CuSO_4$, $NiCl_2$, $ZnSO_4$ and $CdCl_2$ were prepared at 1.0 M concentrations sterilized by filtration through 0.22 μm pore-size filters. The metal ions were added to sterilized medium to final concentrations varying from 10 to 5000 μM to determine the MIC. Plates were incubated at 55ºC for 48 hours.

Effects of a combination of heavy metals on bacterial growth: The effects of heavy metals have been determined by adding different combinations (from 10 to 5000 μM for each metal) of Cu(II), Ni(II), Zn(II) and Cd(II). Cultivation was performed in 250 ml Erlenmeyer flasks at 55ºC, by shaking (150 rpm). The growth was estimated by determination of the optical density (Spectrophotometer Genesis 10S, Thermo Scientific, at λ=560 nm) of the culture liquid during incubation.
Metal ions accumulation: To determine the accumulation of have metals ions the isolate was cultivated in medium containing metals at following concentrations: 32 μM of Cu(II), 34 μM of Ni(II), 20 μM of Cd(II) and 30 μM of Zn(II). Bacterial cells were harvested by centrifugation at

6000 rpm for 15 min at 4ºC. The pellet was washed twice with 0.9 % NaCl solution, and then centrifuged again. The cells were disrupted by enzymatic digestion in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mg/ml lysozyme) at room temperature for 3 h. Aliquots of the lysates were conserved with double distilled 1N nitric acid. The concentrations of heavy metal ions were measured by an Elan 9000 ICP mass-spectrometer with indium internal standard and argon plasma [4].

PCR amplification of copA, nikA and czcD genes and sequencing: Genomic DNA was isolated using the CTAB protocol [20] and used as a template for amplification of *copA, nikA* and *czcD*. Primers were designed based on appropriate gene sequences (*nikA* - NC002570, NC014019, NC014103, NC021171; *copA* - NC0144791, NC000964, NC009725, NC006322, NC014019; *czcD* - NC000964, NC014551, NC006582) retrieved from NCBI GeneBank using Primer3 (v.0.4.0) and NCBI Primer-BLAST web tools (http://frodo.wi.mit.edu/; http://www.ncbi.nlm.nih. gov/tools/primer-blast/). Primer sequences are given in table 1. Amplification mixtures were prepared with a final volume of 50 µl and contained 100 ng genomic DNA, 5µl 10xTaq Buffer, 0.8mM dNTP mix, 0.5 µM of each primer, and 0.5U DyNAzyme II DNA polymerase (Thermo Scientific). Amplification was performed under conditions of an initial denaturation at 94ºC for 3 min followed by 30 cycles of denaturation at 94ºC for 1 min, annealing at 54ºC for 30 s, extension at 72ºC for 1 min, with final extension at 72ºC for 10 min. The reactions were subsequently cooled to 4ºC. The PCR product was analyzed by 1.0% agarose gel electrophoresis.

Table 1. Primers used in real-time qRT-PCR

Gene name	Forward Primer (5' → 3')	Reverse Primer (3' → 5')	Product size (bp)
copA	GAGTTGCGAACACTGTGTAG	TAACCTCATATCCTGCATCC	258
nikA	GGTTGGGTTTCATTACAAAA	CTGTACCTACCGGTTAACG	192
czcD	GCTATGGCATCTTTAGCTGT	TGATGCACTCCCTTTATTTC	230

Total RNA extraction and cDNA synthesis: Growth of bacterial cultures was performed in 250 ml flasks containing 50 ml of enrichment medium supplemented with heavy metals at 16 µM Cu(II), 17 µM Ni(II), 10 µM Cd(II) and 15 µM Zn(II) concentrations and two or four times higher concentrations of each metal ion. The flasks were incubated 55ºC with shaking at 150 rpm. RNA was extracted using the RNasy plus mini kit (Qiagen) as described by the manufacturer with some modifications. Genomic DNA was eliminated by RNase-free DNase I treatment during the isolation procedure. Extracted RNA was analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis and stored at -20ºC. SuperScript VIOL cDNA synthesis kit (Invitrogen) was used for cDNA synthesis. After gently mixing of the components, the reaction vial was incubated at 25ºC for 10 min. The cDNA synthesis was performed at 42ºC for 60 min followed by 85ºC for 5 min for inactivation of reverse-transcriptase. cDNA was used in qPCR and stored at -20ºC.

*qPCR:*EXPRESS SYBR GreenER Two-Step qPCR SuperMixs Kit (Invitrogen) was used for qPCR analysis. qPCR reaction in 20 µl of total volume was as follows: 10 µl EXPRESS SYBR GreenER qPCR SuperMix with Premixed ROX, 0.4 µl of each primers (10µM), 1 µl template cDNA, 8.2 µl DEPC-treated water. The thermal cycling condition (using a Bio-Rad iCycler) was: 50ºC for 2 min, 95ºC for 2 min, 40 cycle of 95ºC for 15 sec, 51ºC for 1 min, 68ºC for 15 sec, and 83oC for 1 sec (for signal detection), followed by melting curve analysis: 60°C to 95°C with reads every 0.5°C. Data analysis was carried out using the software provided by Bio-Rad Inc.

The gene expression level was determined by absolute quantification method using a standard curve [21]. Standard curves were constructed based on C(t) values of qPCR amplification using tenfold diluted genomic DNA. Relative expression ratios were calculated by normalization against unit mass [16], using the C(t) values from qRT-PCR, as follows:

$$\text{Ration}=E^{C(t)cont.-C(t)test},$$

where E is the efficiency of the reaction that can be determined using the equation $E=10^{-1/slop}$.

Results and Discussion.

Tolerance and effects of metals ions on cell growth

MIC of various metal ions is presented in tabl. 2. The order of the toxicity of the metals to strain AG4 was found to be Ni<Cu<Zn<Cd. Ni and Cu were less toxic than the other metals. MICs of Cu(II), Ni(II), Zn(II) and Cd(II) for *B. subtilis* AG4 were 3.5 mM, 4.5 mM, 1 mM and 0.5 mM, respectively.

Table 2. Heavy metal tolerance of *Bacillus subtilis* AG4

Metals	MICs (mM)
Ni	4.5
Cu	3.5
Zn	1.0
Cd	0.5

It was shown there is no noticeable difference in bacterial growth rates in case of 16 µM Cu(II), 17 µM Ni(II), 10 µM Cd(II) and 15 µM Zn(II) and without metal ions in the growth medium (fig.1). Thus, the concentrations of metal ions in the medium up to 16 µM Cu(II), 17 µM Ni(II), 10 µM Cd(II) and 15 µM Zn(II) were found not to affect bacterial growth. The presence of all four metal ions in the growth medium at 4 times higher concentration are strongly suppressing of bacteria growth. The stationary phase at mentioned metal concentrations was entered after 4 hours of growth. The intermediate concentrations of heavy metals caused 2 hours lag phase before resuming normal growth rate.

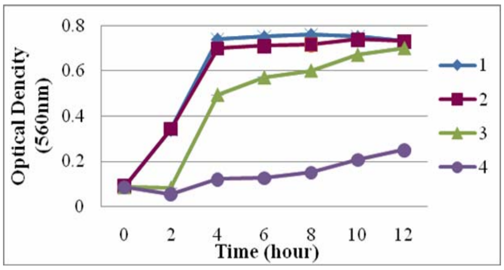


Figure 1. Effects of metals ions complex on *B.subtilis* AG4 growth: 1) metal ions;
2) 16 µM Cu(II), 17 µM Ni(II), 10 µM Cd(II) and 15 µM Zn(II);
3) 32 µM Cu(II), 34 µM Ni(II), 20 µM Cd(II) and 30 µM Zn(II);
4) 64 µM Cu(II), 68 µM Ni(II), 40 µM Cd(II) and 60 µM Zn(II).

The ability of the strain AG4 to grow in the presence of Cu, Ni, Cd and Zn ions in liquid media might be important for the capacity of this bacterium to survive in polluted environments with elevated levels of heavy metals ions. In comparison to previous studies on the metal tolerance of soil bacteria *B. subtilis* AG4 exhibited more resistance to Ni(II) and Cu(II) [18, 23].

Metal bio-accumulation

To determine the metal bio-accumulation ability of *B. subtilis* AG4, a culture was grown in a medium containing 32 µM Cu(II), 34 µM Ni(II), 20 µM Cd(II) and 30 µM Zn(II) up to 0.6 OD. The results are shown in fig.2.

The strain was able to accumulate Cu and Zn ions up to 6.8 and 3.0 mg/g w.w., respectively. A significant amount of Cu ions (~70 %) was removed from the liquid medium. *B. subtilis* AG4 is capable to removing significant amount of Cu from the liquid medium in comparing to previous studies [15, 23].

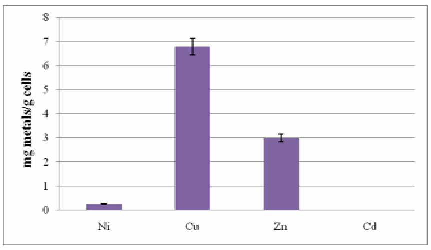


Figure 2. Accumulation of heavy metals ions by strain *B. subtilis* AG4.
The metal ions concentrations within the cells are given in mg per g ww.

Amplification of nikA, copA and czcD genes; genes expression in the presence of Cu(II), Ni(II), Zn(II) and Cd(II)

Evidence for the presence of the *nikA* and *copA* genes in the genome of *B. subtilis* AG4 was revealed by sequencing of obtained PCR products (~200 bp) PCR (tabl. 2). The *czcD* gene was not amplified (fig. 3). The absence of the *czcD* gene in the genomic DNA suggests that it may be plasmid located, or that an alternative resistance mechanism for Zn(II) and Cd(II) might be present.

To assess the gene expression response to the heavy metal stress conditions AG4 were grown in the presence of the different concentrations of metal ions, and the expression of *nikA* and *copA* were analyzed by RT-qPCR.

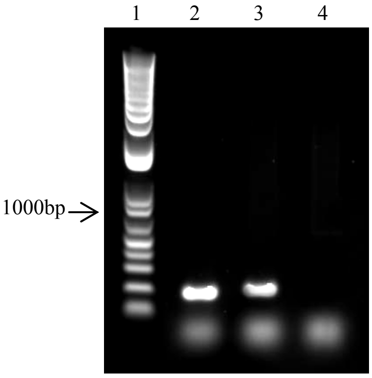


Figure 3. Agarose gel electrophoresis of PCR products. Lanes: 1- 1kb pus DNA size (Invitrogen), 2- *nikA* product, 3- *copA* product, 4- *czcD* product.

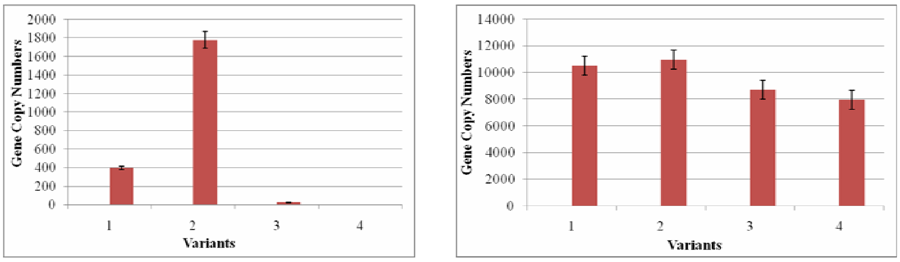
Table 3. Closest match of the *nikA* and *copA* gene amplicons based on BLAST searchers.

Genes	Sequence length (bp)	Closest match (Accession number)	Identity %
nikA	155	Gene encoding nickel import ABC transporter, nickel-binding protein NikA (CP001983)	97
copA	210	Gene encoding putative ABC efflux transporter (ATP-binding protein) (CP002468)	95

Highest expression *copA* and *nikA* genes was observed in the presence of a combination of Cu(II), Ni(II), Cd(II) and Zn(II) in 16, 17, 10 and 15 µM, correspondingly.

The *nikA* gene expression was 3 fold higher at the above mentioned concentrations of the heavy metals than at the absence of the metals in the growth medium, but hardly detectable and absent at higher metal concentrations (conditions 3

and 4 respectively) (fig. 4a). The *copA* gene expression is reduced, 3 and 7 fold less in the conditions 3 and 4, respectively in the comparing with the control (fig. 4b). Although the high metal concentrations reduced the expression of the *copA* gene it is constitutively expressed in the absence or presence of different concentrations of metal ions.



a b

Figure 4. Relative expression levels for the *nikA (*a) and *copA* (b) genes in the different variants:
1) – metal ions; 2) 16 μM Cu(II), 17 μM Ni(II), 10 μM Cd(II) and 15 μM Zn(II);
3) 32 μM Cu(II), 34 μM Ni(II), 20 μM Cd(II) and 30 μM Zn(II);
4) 64 μM Cu(II), 68 μM Ni(II), 40 μM Cd(II) and 60 μM Zn(II).

The stimulation of the metal ions uptake by low concentrations of heavy metal ions could be explained by well-known Arndt-Shultz effect consisting in the intensification of bacterial metabolism [2]. The high levels of the accumulated metal ions lead to activation of the resistance systems [13]. In case of Ni transport in *B. subtilis* AG4, the very low accumulation of the Ni(II) at high concentrations of metals was absorbed (fig. 2). It could be assumed that the uptake of Ni into the cell is prevented by the reduced synthesis of the NikA membrane Ni binding protein (fig. 4(a)) [3, 10].

The reduced expression level of Cu ions efflux P-type ATPase encoded by *copA* gene leads to accumulation of Cu(II) within the cell (fig. 2). Moreover, the gene expression is not stopped and, in case of certain concentrations of the intracellular Cu(II), the Cu(II) binding CopA protein is still synthesized to control the Cu ions homeostasis in the cell.

The effects of different concentrations of a combination of the heavy metals ions Cu(II), Ni(II), Zn(II) and Cd(II) on the growth, metal bio-accumulation and the expression of the *copA* and *nikA* genes of *Bacillus subtilis* AG4 isolated from the Sotk Gold Mine (Armenia) were studied. The ability of *B. subtilis* AG4 to survive in the presence of different concentration of combined metal ions and to accumulate significant amounts of Cu(II) from the growth medium makes it interesting as a potential biotechnological tool for a bioremediation processes of polluted environments. The results indicate a chromosomal localization of the *nikA* and *copA* genes and important roles in the Ni(II) and Cu(II) homeostasis in the cell.

Acknowledgements: The work was supported by Basic support from the Ministry of Education and Sciences of Armenia and by the CPEA-2011/10081 grant from the Norwegian Cooperation Program in Higher Education with Eurasia. The authors express sincerely gratitude to Mrs. Marit Madsen for great support.

REFERENCES

1. *Bruins M.R., Kapil S., Oehme F.W.* Microbial resistance to metals in the environment, Ecotoxicology and Environmental Safety, 45, pp. 198-207, 2000.
2. *Calabrese E.J., Baldwin L.A.* Chemical hormesis: its historical foundation as a biological hypothesis, Human & Experimental Toxicology, *19*, pp. 2-31, 2000.

3. *Chivers P.T., Benanti E.L., Heil-Chapdelaine V., Iwig J.S., Rowe J.L.* Identification of Ni-(L-His)□ as a substrate for NikABCDE-dependent nickel uptake in *Escherichia coli*, Metallomics, *4*, 10, pp. 1043-1050, 2012.
4. *Clesceri L.S., Greenberg A.E., Eaton A.D.* Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th edition USA, pp. 1.27-3.52, 1998.
5. *Eitinger Th., Rodionov D.A., Grote M., Schneider E.* Canonical and ECF-typeATP-binding cassette importers in prokaryotes: diversity inmodular organizationand cellular functions, FEMS Microbiology Reviews, *35,* pp. 3-67, 2011.
6. *Ma Z., Jacobsen E.F., Giedroc D.P.* Metal Transporters and Metal Sensors: How Coordination Chemistry Controls Bacterial Metal Homeostasis, Chem Rev., *109*, 10, pp. 4644-4681, 2009.
7. *Margaryan A.* New metal-tolerant bacilli strains as a prospective tool for bioremediation, Book of Proceedings 5th International Symposium on Biosorption and Bioremediation, p. 17-23, 2012.
8. *Moore Ch. M., Gaballa A., Hui M., Rick W.Ye, Helmann J.D.* Genetic and physiological responses of *Bacillus subtilis* to metal ion stress, Molecular Microbiology, *57*, 1, pp. 27-40, 2005.
9. *Moore Ch. M. and Helmann J.D.* Metal ion homeostasis in *Bacillus subtilis*, Current Opinion in Microbiology, *8*, pp. 188-195, 2005.
10. *Mulrooney S.B., Hausinger R.P.* Nickel uptake and utilization by microorganisms, FEMS Microbiology Reviews, *27,* pp. 239-261, 2003.
11. *Nies D.H.* Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. FEMS Microbiol Rev, *27*, 313-339, 2003.
12. *Nies D.H. and Silver S.* Ion efflux involved in bacterial metal resistances, Journal of Industrial Microbiology, *14,* pp. 186-199, 2005.
13. *Nies D.H. and Silver S.* Molecular microbiology of heavy metals, Microbiology Monographs, *6*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 460, 2007.
14. *Nies D.H.* Microbial heavy-metal resistance, Appl Microbial Biotechnol, pp. 730-750. 1999.
15. *Ozdemir S., Kiline E., Poli A., Nicolaus B., Guven K.* Cd, Cu, Ni, Mn and Zn resistance and bioaccumulation by thermophilic bacteria, *Geobacillus toebii* subsp. decanicus and *Geobacillus thermoleovorans* subsp. stromboliensis, World J. Microbiol Biotechnol, *28*, Issue 1, pp 155-163, 2012.
16. *Pfaffl M.W.* A-Z of quantitative PCR (Editor: SA Bustin), Chapter 3. Quantification strategies in real-time PCR, International University Line (IUL), La Jolla, CA, USA, publication year 2004, pp. 87-112. (2003)
17. *Rademacher C. and Masepohl B.* Copper-responsive gene regulation in bacteria, Microbiology, *158,* pp. 2451-2464, 2012.
18. *Rathnayake I.V.N., Megharaj M., Bolan N., Naidu R.* Tolerance of heavy metals by gram positive soil bacteria, International Journal of Civil and Environmental Engineering, *2*, 4, pp. 191-195, 2010.
19. *Silver S., Phung Le T.* Bacterial heavy metal resistance: New surprises. Annu. Rev Microbiol, pp. 753-789, 1996.
20. *Solioz M., Abicht H.K., Mermod M., Mancini S.* Response of Gram-positive bacteria to copper stress, Journal of Biological Inorganic Chemistry, *15*, pp. 3-14, 2010.
21. *William S. and Helene Feil* Bacterial genomic DNA isolation using CTAB. Doe Joint Genomic Institute. http://my.jgi.doe.gov/general/protocols/JGI-Bacterial-DNA-isolation-CTAB-Protocol-2012.pdf, 2004.
22. *Whelan J.A., Russell N.B., Whelan M.A.* A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR, J. Immunol Methods, *278*, 1-2, pp. 261-269, 2003.
23. *Yilmaz I.E.* Metal tolerance and biosorption of *Bacillus circulans* strain EB1, Research in Microbiology, *154,* pp. 409-415, 2003.

Received on 30.01.2013

Հայաստանի Գիտությունների Ազգային Ակադեմիա
Национальная Академия Наук Армении
National Academy of Sciences of Armenia

Հայաստանի Կենսաբանական Հանդես
Биологический Журнал Армении
Biological Journal of Armenia

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

Biolog. Journal of Armenia, 3 (65), 2013

STUDY OF THE HIND LIMB GRIP STRENGTH OF X-CHROMOSOME-LINKED MUSCULAR DYSTROPHY (MDX) MOUSE NOT AFFECTED BY DAILY VOLUNTARY WHEEL RUNNING

Y.H. SAPONJIAN

Institute of Molecular Biology NAS RA
Saponjian.Yero@MGH.Harvard.edu, hrasap@rambler.ru

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is the most common, severe, and lethal pediatric neuromuscular disorder in the world. Mutations in the dystrophin gene result in absence or dysfunction of dystrophin protein, leading to rapid and subjugating progression of muscle degeneration and necrosis along with gradual impairment of myofiber regenerative capacity. Children with DMD are confined to a wheelchair by early teens due to severe and progressive muscle atrophy and succumb to death in early adulthood primarily due to cardiopulmonary failure. There is currently no cure or proven effective treatment for this devastating disorder. The use of exercise to decrease the amount and decelerate the progression of muscle wasting in DMD patients remains controversial due to contradictory experimental findings. The purpose of this study was to determine whether strength and endurance training has any beneficial or deleterious impact on dystrophic muscle performance. The X-chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) mouse was utilized as it is genetically homologous to human DMD. The results indicate that four-week-long voluntary wheel running had marginal beneficial effect on hind limb grip strength of one mdx mouse and had no deleterious effects in three other mdx mice.

Duchenne muscular dystrophy – dystrophin – mdx mouse – strength and endurance training – voluntary running – grip strength

Դյուշենի մկանային դիստրոֆիան (ԴՄԴ) աշխարհում ամենատարածված, ամենածանրընթաց և ամենամահացու մանկական նյարդամկանային հիվանդությունն է: Դիստրոֆին գենի մուտացիաները հանգեցնում են դիստրոֆին պրոտեինի բացակայությանը կամ դիսֆունկցիային, որը բերում է մկանների արագ զարգացող դեգեներացիայի ու նեկրոզի և մկանների ռեգեներացիոն ունակության աստիճանական խախտման: ԴՄԴ-ով երեխաները մկանների խորը և պրոգրեսիվող ատրոֆիայի հետևանքով դեռահաս տարիքում գամվում են հաշմանդամության սայլակին և վաղ պատանեկության շրջանում մահանում են հիմնականում սիրտ-թոքային անբավարարությունից: Ներկայումս չկա ոչ միայն ԴՄԴ-ի վերջնական բուժում, այլև չկան հաստատված, լիովին օգտակար վարման միջոցներ: ԴՄԴ-ով հիվանդների մոտ մկանների ատրոֆիան նվազեցնելու և պրոգրեսիան դանդաղեցնելու համար վարժությունների օգտագործումը մնում է վիճահարույց՝ փորձարարական իրարամերժ արդյունքների պատճառով: Այս գիտահետազոտական աշխատանքի նպատակն էր պարզել, թե ուժային և տոկունության վարժությունները դիստրոֆիկ մկանների գործունեության վրա օգտակար, թե վնասակար ազդեցություն ունեն: Օգտագործվել է X-քրոմոսոմով պայմանավորված մկանային դիստրոֆիայով (mdx) մուկը, քանի որ այն գենետիկորեն համանման է ԴՄԴ-ով մարդուն: Արդյունքները ցույց տվեցին, որ անիվի մեջ 4 շաբաթ կամավոր վազելը հետին վերջույթների բռնելու ուժի վրա մեկ մկան մոտ ունեցել է չնչին դրական ազդեցություն, իսկ մյուս երեքի մոտ չի ունեցել վնասակար ազդեցություն:

Դյուշենի մկանային դիստրոֆիա – դիստրոֆին – mdx մուկ – ուժային և տոկունության վարժություն – կամավոր վազք – բռնելու ուժ

Мышечная дистрофия Дюшенна (МДД) является самым распространенным, тяжелым и смертельным педиатрическим нервно-мышечным расстройством в мире. Мутации гена дистрофина приводят к отсутствию или дисфункции протеина дистрофина, что приводит к быстрому прогрессированию дегенерации мышц и некрозу наряду с постепенным затуханием регенеративной способности мышечных волокон. Дети с МДД прикованы к инвалидной коляске с раннего подросткового возраста из-за серьезной и прогрессирующей атрофии мышц и умирают в раннем юношеском возрасте в основном из-за сердечно-легочной недостаточности. В настоящее время нет лечения или проверенных эффективных методов ведения больных с этим разрушительным расстройством. Использование упражнений для уменьшения степени и замедления прогрессирования атрофии мышц у пациентов с МДД остается спорным в связи с противоречивыми экспериментальными данными. Целью данного исследования было определить имеют ли силовые нагрузки и упражнения на выносливость какое-либо полезное или вредное влияние на производительность дистрофических мышц. Была использована мышь с мышечной дистрофией, связанной с Х-хромосомой (*mdx*), так как она генетически гомологична человеку с МДД. Результаты показали, что четырехнедельный добровольный бег в колесе оказал незначительное положительное влияние на силу захвата задних конечностей одной мыши mdx и не имел вредных эффектов у трех других мышей *mdx*.

Мышечная дистрофия Дюшенна – дистрофин – mdx мышь – силовые нагрузки и упражнения на выносливость – добровольный бег – сила захвата

Duchene muscular dystrophy (DMD) is the world's most prevalent, devastating, and fatal pediatric neuromuscular disorder [5, 7]. It is an X-chromosome-linked recessive disorder caused primarily by frame-shift deletions, duplications or point mutations in the dystrophin gene, resulting in a complete absence or loss of critical functional domains of dystrophin protein [12, 13]. Localized to the cytoplasmic surface of sarcolemma in muscle fibers, 427-kDa dystrophin protein, along with other sarcolemmal proteins and glycoproteins, is part of the large trans-membrane oligomeric dystrophin-glycoprotein complex (DGC), which provides a mechanical link between the subsarcolemmal cytoskeleton and laminin in the extracellular matrix [9, 13]. In DMD patients, dystrophin deficiency leads to disruption of the DGC and thus compromised sarcolemmal integrity, which results in increased muscle susceptibility to damage and degeneration due to contraction-induced membrane stresses [5, 7, 13]. In the early stages of the disease muscles of individuals with DMD undergo continuous cycles of pervasive degeneration of individual dystrophic muscle fibers accompanied by extensive myofiber regeneration, resulting in widespread fiber size variation and substantial number of centrally-nucleated fibers [5, 7]. However, rapid and subjugating progression of muscle fiber degeneration along with gradual diminution of myofiber regenerative capacity result in necrotic muscle fibers and their eventual replacement with adipose and connective tissue. Failure to replace necrotic muscle fibers eventually results in an insufficient number of muscle cells for mobility and respiration [5, 7].

Clinical symptoms of DMD become evident between 2-5 years of age. Severe and precipitously progressive muscle wasting in boys with DMD confines them to a wheelchair by early teens and they succumb to death in their late teens to early 20s primarily from cardiopulmonary failure [5, 7]. There is currently no cure or proven effective treatment for this devastating disorder [2, 3]. Various therapies have been proposed to decrease the amount and decelerate the progression of muscle wasting in DMD patients [4, 17]. Use of strength and endurance training for improving muscle performance in dystrophinopathies remains controversial as contradictory findings have been reported with regards to the impact of exercise on dystrophic muscles [6, 18]. On one hand moderate strength and endurance training have both been reported to either have some beneficial effects [6, 8] or no deleterious effects [18] on the progression of the disease. On the other hand increased

work of dystrophic muscles has been conjectured to be harmful by making muscles more susceptible to injury and accelerated functional impairment due to imbalance between muscle injury and repair processes in dystrophinopathies [10, 16].

The X-chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) mouse is the most highly utilized animal model of DMD [1, 9]. It is genetically homologous to human DMD as it has loss-of-function mutation in the highly conserved dystrophin gene, resulting in deficiency of highly conserved dystrophin protein in muscles [1, 14]. The purpose of this study was to study the impact of strength and endurance training on skeletal muscle performance in the *mdx* mouse by determining whether voluntary wheel running exercise has any beneficial or deleterious effects on hind limb grip strength of dystrophic mice.

Materials and methods. All animal experimental procedures were conducted in strict accordance with the United States National Institutes of Health (NIH) Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the Subcommittee on Research Animal Care (SRAC), which serves as the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) for Massachusetts General Hospital (MGH) and Harvard Medical School (HMS). Adult *mdx* (C57BL/10ScSn-DMD^{mdx}/J) mice were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) and housed in a pathogen-free facility, under constant room temperature and humidity, and 12/12 hour light/dark cycle. Both water and food (Prolab IsoPro RHM 3000 by LabDiet) were available *ad libitum*. Upon completion of experiments, all mice were euthanized via CO2 inhalation and cervical dislocation.

Voluntary Running Age-matched *mdx* (n=4) male mice were individually housed in standard rat cages for 28 consecutive days from 16 to 20 weeks of age. All cages were equipped with 4½ inch Mini Run-Around Exercise Wheels (Super Pet). The running wheels were fitted with BC 401 bicycle odometers (Sigma Sport) activated by wheel rotation, and calibrated to the wheel size, as previously described [11]. The mice were allowed free access to the wheels at all times.

Grip Strength & Fatigability Weekly, between the ages of 16 to 20 weeks all *mdx* mice were weighed and tested for hind limb grip strength using a Grip Strength Meter with Single Computerized Sensor with RS-232 interface and with Mesh Hind Limb Pull Bar Assembly (Columbus Instruments) as previously described [11, 15]. Upon being pulled by the tail base parallel to the mesh assembly, maximal force was measured as the force applied to the angled mesh pull bar at the moment the animal's hind limb grip was released. Five consecutive hind limb maximal force measurements were recorded for each session. Mean daily and weekly hind limb grip strength values were calculated along with mean grip strength values per trial. Data were normalized to body weight and expressed as N/g. Student's *t*-test was used for 2 variable comparisons.

Results and Discussion. Hind limb grip strength measurement data for the MDX 1 (fig. 1-1) and MDX 2 (fig. 1-2) mice showed that the overall average grip strength differences among trials 1-3 between the ages of 16 to 20 weeks old were not statistically significant from each other. However, both MDX 1 and MDX 2 mice exhibited gradual fatigability each week after trial 3 of five consecutive hind limb grip strength measurement trials. For the MDX 1 mouse the overall average grip strength at trial 5 ($7.24 \pm 0.04 \cdot 10^{-3}$ N/g) was 6.46% less ($p<0.001$) than the overall average grip strength at trial 3 ($7.74 \pm 0.05 \cdot 10^{-3}$ N/g) (fig. 1-1F). For the MDX 2 mouse the overall average grip strength at trial 5 ($7.26 \pm 0.04 \cdot 10^{-3}$ N/g) was 7.37% less ($p<0.001$) than the overall average grip strength at trial 3 ($7.84 \pm 0.1 \cdot 10^{-3}$ N/g) (fig. 1-2F). The MDX 3 mouse (fig. 1-3) demonstrated a 3.73 % increase ($p < 0.05$) in the overall average grip strength between trial 1 ($7.25 \pm 0.08 \cdot 10^{-3}$ N/g) and trial 3 ($7.52 \pm 0.03 \cdot 10^{-3}$ N/g) followed by a 4.02 % decrease ($p<0.001$) from trial 3 to trial 5 ($7.22 \pm 0.02 \cdot 10^{-3}$ N/g) (fig. 1-3F). For the MDX 4 mouse (fig. 1-4) the difference in overall average grip strength between trials 1 and 2 was not statistically significant, however there was a gradual fatigability after trial 2 as trial 5 ($7.212 \pm 0.02 \cdot 10^{-3}$ N/g) was 8.69% less ($p<0.001$) than trial 2 ($7.898 \pm 0.11 \cdot 10^{-3}$ N/g) (fig. 1-4F).

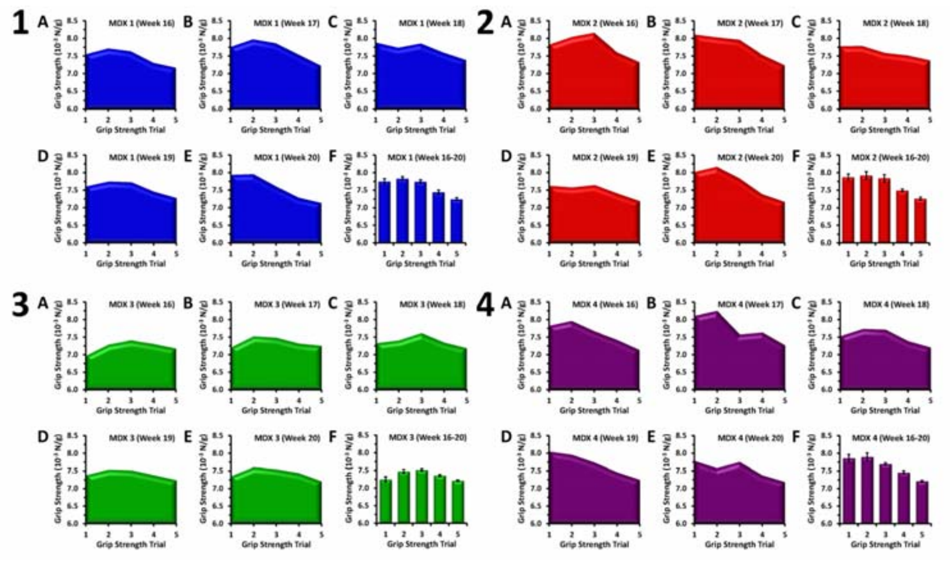


Fig. 1. Hind limb grip strength quantification for the MDX 1 (1-1), MDX 2 (1-2), MDX 3 (1-3), and MDX 4 (1-4) mice. (A-E) Grip strength data corresponding to five consecutive hind limb maximal force measurements recorded weekly during five consecutive weeks between the ages of 16-20 weeks for each mouse respectively. (F) Overall averages of grip strength measurements per trial encompassing weeks 16 to 20 for each mouse respectively. Data are expressed as mean ± SEM.

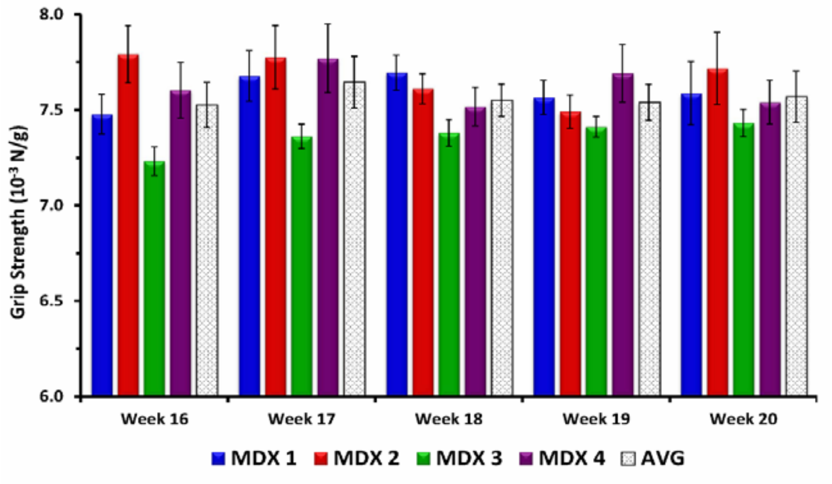


Fig. 2. Averages of hind limb grip strength measurements per week per animal between the ages of 16 to 20 weeks old. Data are expressed as mean ± SEM.

The weekly average hind limb grip strength for the MDX 3 mouse on week 16 ($7.23 \pm 0.07 \cdot 10^{-3}$ N/g) had gradually increased by 2.77 % ($p=0.089$) by week 20 ($7.43 \pm 0.07 \cdot 10^{-3}$ N/g) (fig. 2). The abovementioned difference did not reach statistical significance. There were no statistically significant differences between the weekly average hind limb grip strength data for the MDX 1, MDX 2, and MDX 4 mice (fig. 2). In summary, the aforementioned findings en masse indicate that all mdx mice exhibited gradual fatigability after the first two or three hind limb grip strength measurement trials during five conse-

cutive trials conducted weekly between the ages of 16 to 20 weeks old. Furthermore, this study demonstrates that strength and endurance training exercise, specifically four-week-long voluntary wheel running, had marginal beneficial impact on dystrophic muscle performance or at minimum was not deleterious to skeletal muscle function as corroborated by hind limb grip strength measurement data.

REFERENCES

1. *Bulfield G, Siller WG, Wight PA, Moore K.J.* X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. Proc Natl Acad Sci USA, *81*, 1189-92, 1984.
2. *Bushby K., Finkel R., Birnkrant D.J., et al.* Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. Lancet Neurol 2010;9:77-93.
3. *Bushby K., Finkel R., Birnkrant D.J., et al.* Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: implementation of multidisciplinary care. Lancet Neurol 2010;9:177-89.
4. *Chamberlain J.S., Rando T.A.* Duchenne Muscular Dystrophy: Advances in Therapeutics. New York: Taylor & Francis Group, 2006. 496.
5. *Dubowitz V.* Duchenne muscular dystrophy. In: Muscle Disorders in Childhood. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1995: 38-72.
6. *Dupont-Versteegden E.E., McCarter R.J., Katz M.S. V*oluntary exercise decreases progression of muscular dystrophy in diaphragm of mdx mice. J. Appl. Physiol., *77*, 1736-41, 1994.
7. *Emery A.E., Muntoni F.* Duchenne Muscular Dystrophy. 3rd ed. New York: Oxford University Press, 270, 2003.
8. *Hayes A, Williams D.A.* Beneficial effects of voluntary wheel running on the properties of dystrophic mouse muscle. J. Appl. Physiol., *80*, 670-9, 1996.
9. *Hoffman E.P., Brown R.H., Jr., Kunkel L.M.* Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. Cell, *51*, 919-28, 1987.
10. *Hudecki M.S., Pollina C.M., Granchelli J.A., et al.* Strength and endurance in the therapeutic evaluation of prednisolone-treated MDX mice. Res Commun Chem Pathol Pharmacol., *79*, 45-60, 1993.
11. *McClure W.C, Rabon R.E., Ogawa H., Tseng B.S.* Upregulation of the creatine synthetic pathway in skeletal muscles of mature mdx mice. Neuromuscul Disord, *17*, 639-50, 2007.
12. *Muntoni F., Torelli S., Ferlini A.* Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. Lancet.. Neurol., *2*, 731-40, 2003.
13. *Roberts R.G.* Dystrophin, its gene, and the dystrophinopathies. Adv. Genet., 33, 177-231, 1995.
14. *Sicinski P., Geng Y., Ryder-Cook A.S., Barnard E.A., Darlison M.G., Barnard P.J.* The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. Science *244*, 1578-80, 1989.
15. *Spurney C.F., Gordish-Dressman H., Guerron A.D., et al.* Preclinical drug trials in the mdx mouse: assessment of reliable and sensitive outcome measures. Muscle Nerve, *39*, 591-602, 2009.
16. *Stedman H.H., Sweeney H.L., Shrager J.B., et al.* The *mdx* mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy, Nature, *352*, 536-9, 1991.
17. *Tidball J.G., Wehling-Henricks M.* Evolving therapeutic strategies for Duchenne muscular dystrophy: targeting downstream events. Pediatr. Res., *56,* 831-41, 2004.
18. *Voet N.B., van der Kooi E.L., Riphagen, I.I., Lindeman E., van Engelen B.G., Geurts A.C.* Strength training and aerobic exercise training for muscle disease. Cochrane Database Syst. Rev. *7*, CD003907, 2013.

Received on 06. 03.2013

Հայաստանի Գիտությունների Ազգային Ակադեմիա
Национальная Академия Наук Армении
National Academy of Sciences of Armenia

Հայաստանի Կենսաբանական Հանդես
Биологический Журнал Армении
Biological Journal of Armenia

Biolog. Journal of Armenia, 3 (65), 2013

Cu (II) (PICOLINYL-L-TRYPTOPHAN)$_2$ AS AN EFFECIENT MULTIFUNCTIONAL RADIOPROTECTOR

T. ZH. HOVSEPYAN

Institute of Molecular Biology NAS RA
t_hovsepyan@mb.sci.am

Ionizing radiation (IR) exposure is triggering inflammation and increased rate of apoptosis leading to generation of tissue damaging agents and cell death. In the present study we investigated the effects of potential radioprotector, copper complex of L-tryptophan Schiff base derivative, Cu(II)(picolinyl-L-tryptophan)$_2$, on the blood levels of inflammatory and apoptotic markers, prostag-landin-E$_2$ and B-cell lymphoma 2-associated X protein, circulating immune complexes and key enzymes of the native antioxidant system superoxide dismutase and catalase in animal model of ionizing radiation. The results obtained demonstrated that Cu(II)(picolinyl-L-tryptophan)$_2$ possesses normalizing effects towards the IR-induced alterations in inflammatory response, antioxidant system activation and apoptotic cell death when administered to animals 1 hour before their exposure to IR. On the base of these results we concluded that Cu(II)(Picolinyl-L-tryptophan)$_2$ may be considered a multifunctional radioprotective agent.

Antioxidant system enzymes – B-cell lymphoma 2-associated X protein – circulating immune complexes – Cu(II)(picolinyl-L-tryptophan)2 – ionizing radiation – prostaglandin-E$_2$

Իոնիզանցնող ճառագայթումը (ԻՃ) առաջացնում է բորբոքային պրոցեսներ և բարձրացնում ապոպտոզի մակարդակը, ինչը հանգեցնում է հյուսվածք վնասող գործոնների ձևավորմանը և բջջի մահվան: Աշխատանքում մենք ուսումնասիրել ենք պոտենցիալ ռադիոպաշտպանիչ միացության՝ L-տրիպտոֆանի Շիֆֆի հիմքի ածանցյալ Cu(II)(պիկոլինիլ-L-տրիպտոֆանատ)$_2$-ի ազդեցությունը կենդանի մոդելների արյան մեջ բորբոքային և ապոպտոտիկ մարկերների՝ պրոստագլանդին E$_2$-ի, B բջջային լիմֆոմայի հետ ասոցիացված X սպիտակուցի, շրջանառու իմունային համալիրների և բնական հակաօքսիդանտային համակարգի առանցքային ֆերմենտների՝ սուպերօքսիդդիսմուտազի և կատալազի մակարդակների վրա իոնիզացնող ճառագայթման պայմաններում: Հետազոտությունների արդյունքները ցույց են տալիս, որ ճառագայթումից 1 ժ առաջ փորձարկվող կենդանիների օրգանիզմ ներարկված Cu(II)(պիկոլինիլ-L-տրիպտոֆանատ)$_2$-ը օժտված է ԻՃ հետևանքով առաջացած փոփոխությունները կարգավորող, հակաօքսիդանտային համակարգն ակտիվացնելու հատկություն-ներով և առաջ է բերում ապոպտոտիկ բջիջների մահ: Հիմնվելով ստացված տվյալների վրա՝ եզրակացրել ենք, որ Cu(II)(պիկոլինիլ-L-տրիպտոֆանատ)$_2$-ը կարող է հանդիսանալ որպես բազմա-ֆունկցիոնալ ռադիոպաշտպանիչ ագենտ:

հակաօքսիդանտային համակարգի ֆերմենտներ – B բջջային լիմֆոմայի հետ ասոցիացված X սպիտակուց – շրջանառու իմունային համալիրներ – Cu(II)(պիկոլինիլ-Լ-տրիպտոֆանատ)$_2$ – իոնիզացնող ճառագայթում – պրոստագլանդին-E$_2$

Ионизирующая радиация (ИР) вызывает воспаление и повышает уровень апоптоза, что приводит к образованию разрушающих ткань факторов и гибели клетки. Нами исследовано влияние потенциального радиопротектора производного Шиффового основания L-триптофана, Cu(II)(пиколинил-L-триптофаната)$_2$ на уровни маркеров воспаления и апоптоза, простагландина-E$_2$, X белка ассоциирующего с лимфомой B- клеток, циркулирующих иммунных комплексов, и ключевых ферментов антиоксидантной системы супероксид-дисмутазы и каталазы в крови у животных, подвергшихся влиянию ИР. Результаты показали, что Cu(II)(пиколинил-L-триптофанат)$_2$, полученный за час до облучения, нормализует изменения, вызванные воспалительным ответом, активирует антиоксидантную систему

и регулирует апоптотическую гибель клетки. На основании полученных результатов мы заключили, что Cu(II)(пиколинил-L-триптофанат)$_2$ может быть использован как мультифункциональный радиозащитный агент.

Ферменты антиоксидантной системы – X белок ассоциирующий с лимфомой B-клеток – циркулирующие иммунные комплексы – Cu(II)(пиколинил-L-триптофанат)$_2$ – ионизирующая радиация – простагландин-E$_2$

Exposure to ionizing radiation (IR) causes serious injury to human health, damaging important functional systems of organism and increases the risk of acquiring cancer and other diseases.

Humans are continually exposed to ionizing radiation from many sources. This is called natural background radiation. For most people more than half of their natural background radiation dose comes from radon, a radioactive gas found in natural sources including the ground, underground water, and the atmosphere. Other natural background radiation sources include cosmic radiation from space, naturally occurring radioactive minerals in the ground and in the air, and medical diagnostics and treatments. In general, the health risks associated with this kind of exposure are minimal. If, however, a catastrophic event or accident occurs that results in the exposure of all or mostly all of the body to a high dose of penetrating radiation over a very short period of time, the result is a severe illness known as acute radiation syndrome (ARS). In these circumstances, the key protective systems of the body, such as the immune and antioxidant, mobilize all the reserves of the organism, but finally deplete.

The effects of IR on the immune system depend on the dose received. Massive cell death, inflammation, and infection are the acute effects of high-dose radiation exposure.

Irradiation was reported to induce oxidative stress with overproduction of reactive oxygen species (ROS) such as superoxide radicals (O^{-2}), hydroxyl radicals (OH^{-}), and hydrogen peroxides (H_2O_2) [19], which react rapidly with almost all structural and functional organic molecules, including proteins, lipids, and nucleic acids causing disturbance of cellular metabolism [14]. One of the protective mechanisms here is the enzymatic system, which operates through the sequential and simultaneous actions of a number of enzymes including catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) [10]. SOD, which is localized in various cell compartments, dismutes O^{2-} to H_2O_2 and oxygen [13]. CAT is synthesized in a tissue specific and age dependent manner, scavenges H_2O_2 generated during photorespiration and ß-oxidation of fatty acids [11].

Induction of the arachidonic acid cascade with subsequent production of eicosanoids through the cyclooxigenase and lipooxigenase pathways is one of the indirect effects of (IR). Eicosanoids affect different systems of the organism regulating cell growth, differentiation, and apoptosis. Although, prostaglandins, a family of eicosanoids, produced in response to IR, are known as immune system suppressors and radio-sensitivity-enhancing agents, recently data indicates that prostaglandins, particularly prostaglandin-E$_2$ (PGE$_2$), are radio-protective for normal cells, but only when administered before irradiation [4, 9, 18]. Endogenous prostaglandins act as inflammatory mediators [3]. In addition, promising findings suggest that prostaglandins, especially PGE$_2$, are involved in a new early mechanism of control in the activation of B-cell lymphoma 2-associated X protein (BAX) during apoptosis [9, 18, 8]. IR exposure is triggering inflammation and increase rate of apoptosis-leading to generation of tissue damaging agents and cell death [7]. IR also destroys native antioxidant protective system [1]. One of the primary goals of radioprotective therapy is to develop efficient radioprotective agents diminishing the effects of IR at multiple levels. Earlier, it has been shown that copper complexes with organic compounds exhibit anti-inflammatory and radioprotective activities and are as efficient as radio-protectors [1, 2, 6]. Cu(II) (picolinyl-L-tryptophan)$_2$, a newly synthesized L-tryptophan Schiff

base derivative, was shown to decrease the mortality rate of experimental animals in the conditions of IR [12].

Here, we studied the effects of Cu(II)(picolinyl-L-tryptophan)$_2$ on the blood levels of the inflammatory, apoptotic, and antioxidant mediators including different sub-populations of circulating immune complexes (CIC), the specific activities of the key enzymes of antioxidant system CAT and SOD, PGE_2 and BAX in the conditions of IR.

Materials and methods. Animal model of IR. Experiments were performed using white male rats with 160-180g of body weight. The animals were divided into the following groups: 1) intact animals (IA), 2) irradiated animals, 3) irradiated animals treated by the Cu(II)(picolinyl-L-tryptophan)$_2$ (per oral administration of 10mg per kg of body weight 1 hour before IR). The animals were subjected to a single-dose IR using "RUM-17" X-ray unit (conditions: dose 5 Gy, dose rate 1.78 Gy/min, voltage 200 kV, and current strength 20 mA, without filters and with focal distance 50 cm).

Isolation of serum and erythrocyte from the blood samples. To obtain serum, the blood was collected after decapitation of the animals on the 3rd, 7th, 14th and 28th days after irradiation, left until clotting at room temperature, and then centrifuged at 3000 g for 10 min. The serum was collected and used in further experiments. To isolate erythrocytes, the blood was collected in the tubes with anticoagulant, then centrifuged at 3000 g x 4^0C, 10 min. Precipitated erythrocytes were washed with saline and use in further experiments.

Determination of CIC levels. Total concentration of CIC and a level of large-sized CIC in the serum was determined earlier developed assays [16, 17] and expressed as absorbance units at 280 nm (A_{280}). Serum concentration of CIC subpopulations containing C1q products of the complement system (C1q-CIC) was determined by the the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using commercial kit "IMTEC-C1q-CIC" (Human GmBH, Germany) according to manufacturer's instruction. The levels were expressed in □g per ml of serum (mg/ml).

Determination of SOD and CAT activities. SOD activity in hemolyzed erythrocytes was determined by the earlier developed spectrophotometric assay estimating the extent of inhibition of autooxidation of adrenaline in the alkaline medium by SOD [15]. Specific activity was expressed in the International units of SOD activity per ml of hemolyzed erythrocytes (U/ml).

The acticity of CAT in hemolyzed erythrocytes was determined by using earlier described spectrophotometric assay estimating the decrease in the content of hydrogen peroxide in incubation medium in the presence of catalase [5]. Specific activity was expressed in the International units of CAT activity per ml of hemolyzed erythrocytes (U/ml).

Determination of PGE_2 and Bax levels. PGE_2 and Bax levels in the blood serum were measured by ELISA using commercially available kits (Cayman Chemical Company, USA and Uscn Life Science Inc., China, respectively) according to manufacturers' protocols. The levels were expressed in pg per ml of serum (pg/ml).

Statistical analysis was performed by Student's unpaired t-test and by calculation of Spearman's rank correlation coefficient (Rs). P values ≤ 0.05 were considered as statistically significant.

Results and Discussion. The influence of Cu(II)(picolinyl-L-tryptophane)$_2$ on the levels of different sub-populations of CIC. Beginning from day 14 after exposure to IR a significant increase of the total CIC and large-sized CIC serum levels were observed. Pretreatment of animals with Cu(II) (picolinyl-L-tryptophane)$_2$ before IR decreased the levels of CICs beginning from day 14 after irradiation, as compared to untreated irradiated animals. The obtained results are shown on tabl. 1.

Influence of Cu(II)(picolinyl-L-tryptophane)2 on specific activity of SOD and CAT. According to the data obtained, a statistically significant decrease in SOD activity of hemolyzed erythrocytes was detected in irradiated animals non-treated with Cu(II) (picolinyl-L-tryptophane)$_2$ prior to irradiation, as compared to intact animals. In case of CAT, a significant decrease in this enzyme activity was detected in irradiated animals, as compared with non-irradiated. Pre-treatment with Cu(II) (picolinyl-L-tryptophane)$_2$ before

exposure to IR resulted in increase of SOD activity up to control level. The same effect was observed in case of CAT, thereby increasing the stability of enzymes to ionizing radiation. The obtained results are shown on tabl. 3.

Tabl. 1. The levels of total CIC (mean±SD) in the blood serum of the experimental animals treated and non-treated with Cu(II)(picolinyl-L-tryptophane)$_2$ before irradiation and in intact non-irradiated animals

Group	[Total CIC], A_{280}, □g/ml
Irradiated animals non-treated with Cu(II)(picolinyl-L-tryptophane)$_2$ before exposure to IR	0.29□0.05 (a)
Irradiated animals treated with Cu(II)(picolinyl-L-tryptophane)$_2$ before exposure to IR	0.23□0.02 (b)
Intact animals	0.13□0.01 (c)

The results represent data obtained on day 28 after exposure to IR. a vs. b ($p < 0.05$); a vs. c ($p<0.005$); b vs. c ($p<0.003$).

Tabl. 2. The levels of C1q-CIC (mean±SD) in the blood serum of the experimental animals treated and non-treated with Cu(II)(picolinyl-L-tryptophane)$_2$ before irradiation on different time-points after irradiation and in intact non-irradiated animals

Group	[C1q-CIC], □g/ml
Irradiated animals non-treated with Cu(II)(picolinyl-L-tryptophane)2 before exposure to IR	2.14□0.16
Irradiated animals treated with Cu(II)(picolinyl-L-tryptophane)$_2$ before exposure to IR	0.77□0.18
Intact animals	1.07□0.76

The results represent data obtained on day 28 after exposure to IR. a vs. b ($p < 0.05$).

Tabl. 3. Comparative analysis of superoxide dismutase (SOD) and catalase activity (mean±SD) in the lysate of erythrocytes irradiated animals at a dose of 500 R on day 7th on the background of prior (1 hour before irradiation) subcutaneous injection Cu(II)(picolinyl-L-tryptophane)$_2$

Group	SOD specific activity, U/ml	CAT specific activity, U/ml
Irradiated animals non-treated with Cu(II)(picolinyl-L-tryptophane)2 before exposure to IR	296.76□87.76	22572□542
Irradiated animals treated with Cu(II)(picolinyl-L-tryptophane)2 before exposure to IR	431.24□69.3	16884□1536.1
Intact animals	559.36□62.2	11232□1347.7

Influence of Cu(II) (picolinyl-L-tryptophane)$_2$ on PGE_2-dependant mechanism of Bax-activation. The obtained results indicated that IR-exposure significantly decreases the serum levels of both PGE_2 and Bax, and that pre-treatment with Cu(II)(picolinyl-L-tryptophane)$_2$ diminished these effects (fig.1, 2). In addition, we found a significant positive correlation ($R_s = 0.961$; $p < 0.05$) between the levels of PGE_2 and Bax in irradiated animals treated and non-treated with Cu(II)(picolinyl-L-tryptophane)$_2$before exposure to IR.

The results obtained in the present study indicated that Cu(II) (picolinyl-L-tryptophane)$_2$ can normalize the harmful effects of IR on the immune and antioxidant systems as well as on the apoptotic rate. This particularly applies to the levels of different subpopula tions of CIC, important mediators of the immune response and inflammation, SOD and CAT, the key enzymes of the native antioxidant protective system, and PGE_2-dependant mechanism of Bax-activation. Cu(II) (picolinyl-L-tryptophane)$_2$ might be considered as a prospective multifunctional radio-protective agent.

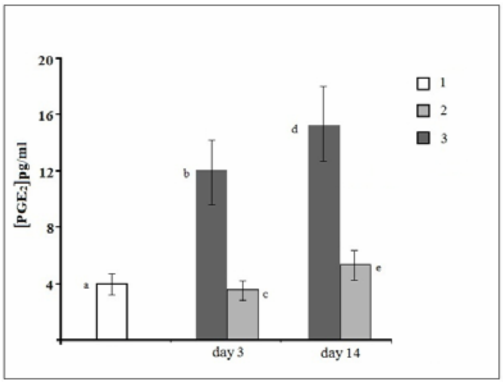


Fig. 1. Serum PGE_2 levels (M±SD) in intact animals (1) as well as in irradiated animals treated (2) and non-treated with Cu(II)(picolinyl-L-tryptophane)$_2$ (3).
a vs. b ($p<0.05$); a vs. d ($p<0.05$); a vs. c ($p>0.05$); a vs. e ($p>0.05$)

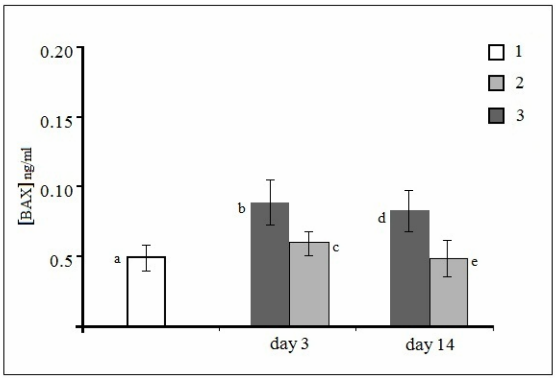


Fig. 2. Postradiation changes in the serum Bax levels (M±SD) in intact animals (1) as well as in irradiated animals treated (2) and non-treated with Cu(II)(picolinyl-L-tryptophane)$_2$ (3).
a vs. b ($p<0.05$); a vs. d ($p<0.05$); a vs. c ($p>0.05$); a vs. e ($p>0.05$)

REFERENCES

1. *Arakelova E., Ayvazyan V., Zhamharyan L., Hovsepyan T., Boyajyan A., Malakyan M., Bajinyan S.* Influence of ionizing radiation on the immune and antioxidant systems of the organism. Georgian Chem. J., *10*, 4, p. 59-62, 2010.
2. *Arakelova E., Ayvazyan V.,Zhamharyan L., Hovsepyan T., Boyajyan A., Malakyan M., Bajinyan S.* Comparative analysis of the influence of the aminoacid Schiff bases and their Copper complexes on the immune and antioxidant status of the organism under ionizing radiation. Proceedings of the International Conference “Physical research methods in medicine”, Tbilisi, p. 13-17, 2011.
3. *Boone D.L., Currie W.D., Leung P.C.* Arachidonic acid and cell signaling in the ovary and placenta. Prostaglandins Leukot Essent Fatty acid, *48*, p. 79-87, 1993.
4. *Choy H., Milas L.,* Enhancing radiotherapy with cyclooxigenase-2 enzyme inhibitors: a rational advace? J Natle Cancer Inst., *95*, 19, p. 1440-1452, 2003.
5. *Gota L.* A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. Clinica Chimica Acta, *196*, p.143-152, 1991.
6. *Iakovidis I, Delimaris I, Piperakis SM.* Cooper and its complexes in medicine: a biochemical approach. Mol. Biol. Int., p.1-13, 2011.

7. *Kim K., McBride W.H.* Modifying radiation damage. Curr Drug Targets, *11*,11, p.1352-1365, 2010.
8. *Lalier L., Cartron P-F., Olivier C., Loge C., Bougras G., Robert M., Oliver L., Vallette FM.* Prostaglandins antagonisticallt control Bax activation during apoptosis. Cell Death and Differentiation, *18*, p. 528-537, 2011.
9. *Lalier L., Pedelaborde F., Braud C., Menanteau J., Vallette F.M., Olivier C.,* Increase in intracellular PGE_2 induces apoptosis in Bax-expressing colon cancer cell. BMC Cancer, *11*, p. 153, 2011.
10. *Larson, R.A.* The antioxidants of higher plants. Phyto Chem., *27*, p. 969-978, 1988.
11. *Lin, C.C. and C.H. Kao.* Effect of NaCl stress on H_2O_2 metabolism in rice leaves. Plant Growth Regul., *30*, p. 151-155, 2000.
12. *Malakyan M.* Investigation of antiradiation activity of Cu(II) complexes with schiff bases derived from L-tryptophan and isomeric pyridinecarboxaldehydes. First International Conference on Radiation and Dosimetry in Various Fields of Research (RAD 2012), Niš, Serbia, p.166, 2012.
13. *Salin, M.L.* Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. Physiol. Plant. *72*, p. 681-689, 1987.
14. *Salter, L. and Hewitt C.N.* Ozonehydrocarbon interactions in plants. Phytochem., *31*, p. 4045-4050, 1992.
15. *Sirota TV.* A new approach to studying the autoxidation of adrenaline: possibility of the determination of superoxide dismutase activity and the antioxidant properties of various preparations by polarography. Biomed Khim, *58*, 1, p. 77-87, 2012.
16. *Struchkov P.V., Konstantinova N.A., Lavrentov V.V., Chuchalin A.G.* Screening test for evaluating the pathogenetic properties of immune complexes. Laboratornoe Delo (Moscow), 7, p.410-412, 1985.
17. *Tarnachka B., Gromadzka G., Czlonkowska A.* Increased circulating immune complexes in acute stroke: the triggering role of Chlamidia pneumonia and cytomegalovirus. Stroke, *33*, 4, p. 936-940, 2002.
18. *Tessner TG., Muhale F., Riehl TE., Anant Sh., Stenson WF.* Prostaglandin E_2 reduces radiation-induced epithelial apoptosis through a mechanism involving AKT activation and bax translocation. J Clin Invest, *114*, p. 1676-1685, 2004.
19. *Xienia, U., G.C. Foote, S. Van, P.N. Devreotes, S. Alexander and H. Alexander. Differential developmental expression and cell type specificity of dictystelium catalases and their response to oxidative stress and UV light. Biochem. Biophys. Acta. 149, p. 295-310, 2000.*

Received on 25.03.2013

Հայաստանի Գիտությունների Ազգային Ակադեմիա
Национальная Академия Наук Армении
National Academy of Sciences of Armenia

Հայաստանի Կենսաբանական Հանդես
Биологический Журнал Армении
Biological Journal of Armenia

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

Biolog. Journal of Armenia, 3 (65), 2013

STUDY OF THE CANCER INCIDENCE IN KIDS AND JUVENILES IN YEREVAN IN RELATION TO AIR AND SOIL POLLUTION ON THEIR DWELLING SITES

H.S. MOVSESYAN[1], R.M. AROUTOUNIAN[2], L.V. SAHAKYAN[3], SH. G. ASMARYAN[3], H.M. GALSTYAN[4], G.K. BAZIKYAN[4], H.A. MARTIROSYAN[2], A.K. SAGHATELYAN[3]

[1]Yerevan State University, Faculty of Biology, Department of Ecology and Nature Protection, hasmikmov@ysu.am
[2]Yerevan State University, Faculty of Biology, Department of Genetics and Cytology, genetik@ysu.am
[3]Center for Ecological-Noosphere Studies of the NAS RA, E-mail: ecocentr@sci.am
[4]National Center of Oncology named after V.A. Fanarjian, Ministry of Health of RA, armoncology@yahoo.com

The article covers a study of correlation between cancer incidence in children and juveniles and indices of air pollution as well as levels of heavy metal pollution of the territory of the Yerevan. No significant correlations of oncological diseases in children and juveniles in Yerevan were revealed with data on air pollution. Spatial correlation between the maps of distribution of oncological cases and values of summary index of heavy metal pollution of soils in 12 districts of Yerevan lead to obtaining the picture of superimposition of the number of disease cases and geochemical series produced for the same sites. The outcomes indicated no correlation of those indices in that case as well.

Cancer incidence – traffic-induced pollution of air – heavy metal pollution of soils

Ուսումնասիրված է հնարավոր համահարաբերակցական կապը երեխաների և երիտասարդների օնկոլոգիական հիվանդությունների բժշկական ցուցանիշների և ծանր մետաղներով Երևանի տարածքի աղտոտման մակարդակի, ինչպես նաև օդի աղտոտման ցուցանիշների միջև: Չի հայտնաբերվել արժանահավատ համահարաբերակցություն երեխաների և երիտասարդների օնկոլոգիական հիվանդությունների բժշկական ցուցանիշների և Երևանում օդի աղտոտման տվյալների միջև: Օնկոլոգիական հիվանդությունների բաշխման քարտեզների և Երևանի 12 վարչական շրջաններում ծանր մետաղներով աղտոտման գումարային ցուցանիշի արժեքների տարածական համադրման միջոցով ստացվել է այդ շրջանների երկրաքիմիական շարքերի հետ հիվանդությունների դեպքերի քանակության միատեղման պատկերը: Նշված ցուցանիշների համահարաբերակցություն չի հայտնաբերվել նաև այս դեպքում:

Ուռուցքաբանական հիվանդացություն – օդի տրանսպորտային աղտոտում – հողերի աղտոտում ծանր մետաղներով

Изучена корреляционная связь между показателями онкологических заболеваний у детей и молодых людей и уровнем загрязнения воздуха, а также территории Еревана, в том числе, тяжелыми металлами. Достоверной корреляционной связи между показателями онкологических заболеваний у детей и молодых людей и уровнем загрязнения воздуха в Ереване не выявлено. Путем пространственного сопоставления карт распределения онкологических заболеваний и значений суммарного показателя загрязнения тяжелыми металлами почв в 12 административных районах г. Еревана получена картина совмещения количества случаев заболеваний с геохимическими рядами для тех же районов. В данном случае также не выявлено корреляционной связи показателей.

Онкологическая заболеваемость – транспортное загрязнение воздуха –- загрязнение почв тяжелыми металлами

At present the environmentalists place a special emphasis on the health of population as it is inseparably linked to the health and stability of natural ecosystems. Zones with high contents of toxic elements are formed around industrial enterprises that threaten the health of the man. Such territories are potential zones of man-made micro-elements. Prior to the 1970s dominating pollutants involved dust, pesticides, CO_x, NO_x, SO_x and so on. Subsequently, the scope of pollutants was added by heavy metals [9, 10].

Recent years have been marked by abundant researches on metal biomonitoring and the role of separate macro- and microelements in health disorders in adults and children as well as on a micro-elementary "portrait" of a scope of diseases, interaction with the genetic apparatus and immune system. Excessive concentrations of metals may induce serious metabolic changes and disturbance of metabolic processes, and this favors the lowering of the organism resistibility, brings to disturbance of allergic and somatic status and finally to dysfunction of diverse organs and systems. The metals affect the process of haematopoiesis, this in turn adding to the immune deficiency of the organism [7]. Multiple long-term exposures to a number of metals and their compounds may result in origination of malignant neoformations as well. Metal ions carcinogenic to humans are Be, Cd, Cr and Ni (Co, Cu, Fe and Pt also can be included in this list). A set of molecular mechanisms was suggested that reflect diverse chemical properties of the noted metals. As indicated by epidemiological investigations, long-term exposure of parents to metals increases a risk of origination of malignant neoformations in their children. This might be connected with pro-mutagenic damage of sperm DNA [14]. The childhood cohort is a unique "indicative group" reflecting the local people's response to adverse impacts of environmental factors. The appropriateness of accounting disease incidence in children is supported by the fact that in contrast to adult they commonly move throughout the city more limitedly, are "tighter" tied to their residence and study sites, are not exposed to direct impacts of occupational harms, practice harmful habits (smoking etc.) to a lesser extent. Due to their anatomic-physiological peculiarities, children are more sensitive to the quality of habitat, and the terms of manifestation of adverse effects in them are shorter. This adds to the significance value of statistical investigations helping make more objective conclusions on "ecological stipulation" of diseases. Oncological diseases in childhood are a rare phenomenon, which however may bring to dramatic consequences. As evidenced by existing evaluations, cancer in European countries is diagnosed in 1 out of 500 children under 15. The role of environmental factors in pathogenesis of oncological diseases in childhood is known to be limited, nevertheless children are more prone to the impact of biological factors potentially connected with development of malignant neoformations (multistage carcinogenesis) as exposition to carcinogens in childhood may subsequently lead to the development of cancer, as reported, for instance, in the case of UV exposure which is a causal agent of development of melanoma [3].

Series of investigations indicated significant relationships between the incidence of oncological disease and some environmental factors [2, 16].

With rare exception, carcinogenesis involves environmental factors that directly or indirectly exert a change in the cell's genome. Virtually all causes of cancer are multifactorial, sometimes involving an inherited predisposition to carcinogenic effects of environ- mental factors, which include chemicals, ionizing radiation, and oncogenic viruses [12].

As stated earlier, childhood cancer is a major concern in many countries, and the role of air pollutants in its etiology has become the issue that increasingly attracts researchers. Many ecological analyses describe the epidemiological evidence on childhood leukemia in relation to traffic-induced pollution of air, with particular reference to diesel exhausts, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and benzene [15]. The results of studies initiated to explore relationships between traffic-induced pollution of air and development of childhood leukemia (14 year of age or younger) showed that there was a significant exposure-response relationship between exposure to traffic emitted pollutants and a risk of leukemia in kids after controlling for possible confounders. A study of environmental and genetic risk factors of childhood cancers and leukemia underpinned the assessment of the effect of exposure to road traffic exhaust fumes on a risk of occurrence of childhood leukemia. The results obtained also support a hypothesis that living close to heavy traffic roads may increase the risk of childhood leukemia [11]. A 16-year-long follow-up of a cohort of 500,000 Americans living in different cities established the association of air pollutants with lung cancer mortality. It was revealed that carcinogenic volatile organic compounds, too, may be related with increasing cases of lung cancer [17]. Chemical contaminants may disrupt the function of the endocrine system and increase the occurrence rate of stillbirths, birth defects, and hormonally dependent cancers such as breast, testicular, and prostate cancers [20].

The amount of vehicles in Yerevan which has been steadily increasing for the last 20 years generates about 90% of air pollution. The city's relief and climatic conditions favor dispersion of gaseous toxicants. Hazardous air pollutants as was mentioned above cause cancer or other adverse health effects. Vehicle engine exhaust includes ultrafine particles with a large surface area and contains absorbed polycyclic aromatic hydrocarbons, transition metals and other substances. Ultrafine particles and soluble chemicals may be transported from the airways to other organs such as the liver, kidneys, and brain and thus increase a risk of origination of malignant neoformations [18].

Materials and methods. Data on cancer incidence in kids and juveniles (under 35 years) who resided in Yerevan were obtained in 2001 through 2010 from the National Center of Oncology after V.A. Fanarjian HM RA: 1) by results of registration of diagnosed patients in the clinics of Yerevan and the Republic of Armenia, 2) by results of autopsies, 3) by quarterly reports on registered patients and lethalities submitted by oncologists from polyclinics of Yerevan and the Republic of Armenia. As a matter of record, in the end of each calendar year the statistical team implements the alphabetic doubling of lists so as to exclude repetition and prepares annual reports on the incidence rate of malignant neoformations, neglected and disease-induced death cases in the city of Yerevan and the Republic of Armenia (form N61 Ж approved by the order of the RA Minister of Health as of 04.10.04, 1009/20).

Except data provided above, we obtained also the indices of levels of total traffic-induced pollution of Yerevan's air with CO, C_xH_x, NO_x. Data were obtained by a method of calculation (mathanalytical method) using satelite images for calculating traffic load, relevant mathematic methods and softwares [1].

As a geochemical base for detecting correlation between medical indices of oncological diseases in children and juveniles and a level of soil pollution with heavy metals, this research used the results of ecologo-geochemical assessment of the territory of the city of Yerevan obtained at the Center for Ecological-Noosphere Studies NAS RA [8, 13, 19]. Based on the outcomes of geochemical survey of Yerevan's soil cover (following a schematic plan sc.1:10 000, horizon A_1, sampling net – maximally approached to even, by methods developed in IMGRE) [4, 5], a geochemical database has been compiled on heavy metal contents. The ecologo-geochemical assessment of pollution of the city's soils and the assessment of the chemical elements accumulation level were done through collation between factual total and background contents (K_c) of metals [4, 5, 6], which is one of anomalousness criteria. By the value of K_c index, ranked geochemical quailtative and quantitative series were produced covering the soils of the entire territory and separate districts of Yerevan.

For an integral characteristic of poly-element pollution of the territory, a summary concentration index (SCI) was calculated which represents a sum of background-standardized contents of elements in a sample [4, 5, 6].

Employing ArcView software and an IDW (Inverse Distance Weighted) method, by SCI of heavy metals specialized geochemical maps were produced which included a map of Yerevan's soils pollution. To reflect the SCI values distribution all over the city's territory a 5-level gradation scale was used [6].

Through spatial collation between maps of distribution of oncological cases and values of SCI of heavy metal pollution (ArcView 3.2a) a picture was obtained of superposition of the number of cases with diverse-level pollution fields. Also, in pro mille (‰) calculated was the number of oncological cases per separate districts with a goal to analyze those data with regard for relevant ranked geochemical series of heavy metals on the same sites.

Results and Discussion. The goal of investigation was to study correlation between cancer incidence in children and juveniles and indices of air pollution as well as levels of heavy metal pollution of the territory of Yerevan cty. Data on the incidence rate of oncological cases among children and juveniles in Yerevan obtained on a basis of the cancer register of the National Center for Oncology for 2001-2010 are as follows (tabl. 1). They were compared with the data on traffic-induced pollution of the air and geochemical series of heavy metals in soils provided by the Center for Ecological-Noosphere Studies of the NAS RA.

Table 1. The incidence rate of oncological cases in kids and juveniles in the city of Yerevan vs. air pollution levels and geochemical series of soils

№/№	District	Population 2007-2010 (mean)	Number of diseased	‰, distr.	Sum of air pollution	Geochemical series of soils	SCI of soil
1.	Achapniak	107350	75	0.699	0.072	$Ag_{(28.0)}$-Pb,$Mo_{(2.5)}$-$Ni_{(2.3)}$-$Co_{(2.0)}$-$Cu_{(1.7)}$-$Cr_{(1.3)}$-$Zn_{(0.9)}$	41.2
2.	Avan	50775	57	1.123	0.122	$Ag_{(40.0)}$-$Pb_{(3.0)}$-$Ni_{(2.3)}$-$Cr_{(1.8)}$-$Mo_{(1.7)}$-$Cu_{(1.5)}$-$Co_{(1.4)}$-$Zn_{(1.1)}$	52.8
3.	Arabkir	131200	112	0.854	0.077	$Ag_{(26.0)}$-$Pb_{(2.8)}$-$Ni_{(2.3)}$-$Mo_{(2.0)}$-$Co_{(1.8)}$-$Cu_{(1.7)}$-$Cr_{(1.3)}$-$Zn_{(1.1)}$	39.0
4.	Davidashen	40700	34	0.835	0.049	$Ag_{(20.0)}$-$Pb_{(2.5)}$-$Ni_{(2.0)}$-$Mo_{(1.7)}$-$Co_{(1.5)}$-$Cu_{(1.3)}$-$Cr_{(1.0)}$-$Zn_{(0.7)}$	30.7
5.	Erebuni	120500	106	0.880	0.089	$Ag_{(26.0)}$-$Pb_{(4.0)}$-$Ni_{(2.3)}$-$Cu_{(2.0)}$-$Cr_{(1.8)}$-$Mo_{(1.7)}$-Co,$Zn_{(1.3)}$	40.4
6.	Kentron	129950	106	0.816	0.176	$Ag_{(40.0)}$-$Pb_{(4.0)}$-$Ni_{(2.3)}$-$Cu_{(2.0)}$-$Cr_{(1.8)}$-Mo,$Zn_{(1.7)}$-$Co_{(1.5)}$	55.0
7.	Malatia-Sebastia	140925	143	1.015	0.198	$Ag_{(26.0)}$-$Pb_{(2.5)}$-$Ni_{(2.3)}$-$Cr_{(1.8)}$-$Mo_{(1.7)}$-$Cu_{(1.5)}$-$Co_{(1.4)}$-$Zn_{(1.1)}$	38.3
8.	Nor-Nork	144975	115	0.793	0.166	$Ag_{(26.0)}$-$Pb_{(2.8)}$-$Ni_{(2.3)}$-$Cr_{(1.8)}$-$Mo_{(1.7)}$-$Cu_{(1.5)}$-$Co_{(1.4)}$-$Zn_{(1.2)}$	38.7
9.	Nork-Marash	11375	5	0.440	0.169	$Ag_{(40.0)}$-$Pb_{(2.8)}$-$Mo_{(2.5)}$-$Ni_{(2.3)}$-$Co_{(2.0)}$-$Cr_{(1.8)}$-$Cu_{(1.5)}$-$Zn_{(1.3)}$	54.2
10.	Nubarashen	9550	7	0.733	0.097	$Ag_{(40.0)}$-$Ni_{(3.4)}$-$Cr_{(1.8)}$-Mo,$Cu_{(1.7)}$-Zn, $Pb_{(1.0)}$	50.6
11.	Shengavit	144275	130	0.901	0.094	$Ag_{(26.0)}$-$Pb_{(3.3)}$-$Ni_{(2.3)}$-$Cu_{(2.2)}$-$Cr_{(1.8)}$-$Mo_{(1.7)}$-$Co_{(1.3)}$-$Zn_{(1.1)}$	39.7
12.	Kanaker	78575	81	1.031	0.217	$Ag_{(28.0)}$-$Pb_{(4.0)}$-$Ni_{(2.3)}$-Cu,$Cr_{(1.8)}$-$Mo_{(1.7)}$-$Co_{(1.4)}$-$Zn_{(1.3)}$	42.3

Geochemical investigations of Yerevan's soils indicate that natural geochemical association of heavy metals is represented by a weak intensive series: Zn (9.4)-Cu(2.9)-Co(1.8) (in brackets, clark exceeding is given). The results of long-term geochemical surveys of the city's soils indicate that the soils are strongly polluted with heavy metals (Pb, Ag, Cu, Ni, Mo, Zn, Cr, Co) predominantly of man-made origin [8,19]. The average

geochemical series calculated for separate districts of Yerevan (tabl. 1) evidence that dominant pollutants in almost all the studied districts are Ag, Pb and Mo.

The research indicated no significant correlations between the incidence rate of oncological diseases in kids and juveniles from 12 districts of Yerevan (‰) and air pollution data ($r=0.154$, $p=0.719$) for the same sites. Also, no significant correlations were established between the incidence rate of oncological diseases in kids and juveniles in Yerevan (‰) and relevant geochemical series of soils (Table 2).

Table 2. Correlation between the incidence rate of oncological diseases in kids and juveniles in the city of Yerevan (in ‰) and geochemical series of soils

‰ cases/district	Summary assessment	Ag	Pb	Mo	Ni	Co	Cu	Cr	Zn
	-0,244	-0,247	0,214	-0,714**	-0,066	-0,738**	0,106	0,134	-0,029
P (2-lateral)	0,445	0,438	0,504	0,009	0,838	0,009	0,744	0,678	0,929

** - significance , $p<0.05$

Negative significant correlation between the incidence rate of oncological diseases in children and juveniles in the city of Yerevan (in ‰) and geochemical series of soils was detected only in respect to cobalt and molybdenum.

The results of our research are preliminary because lots of factors such as social, genetic, as well as personal peculiarities which are of great significance for oncological diseases have not been considered so far. However, existing spatially and temporally defined data will serve as a base for further investigations.

REFERENCES

1. *Այվազյան Ա.Յու.* Տրանսպորտից արտանետվող գազերի ազդեցությունը Երևան քաղաքի օդային ավազանի վրա: Սեղմագիր կենսաբ. գիտ. թեկն. գիտ. աստիճ. հայց. Ատենախոսության, Երևան, 2007:
2. *Геворкян А.М., Зияев Д.А., Киреев Г.В., Асроров А.С.* Промоторы канцерогенов и их определение в объектах окружающей среды. Мат.-лы 5-го Съезда онкологов и радиологов СНГ, Ташкент, с. 45, 2008.
3. Здоровье детей подвергается риску! Основные опасности для здоровья, связанные с воздействием вредных факторов окружающей среды. Факты и цифры ЕРБ ВОЗ/05/03, Копенгаген, 2003, http://www.euro.who.int/document/mediacentre/fs0503r.pdf.
4. Методические рекомендации по геохимической оценке загрязнения территорий городов химическими элементами. Ревич Б.А. и др. М., Изд-во ИМГРЭ, 112 с., 1982.
5. Методические рекомендации по геохимической оценке источников загрязнения окружающей среды.Сает Ю.Е., Барашкевич И.Л., Ревич Б.А., М., Изд-во ИМГРЭ, 66 с., 1982.
6. *Перельман А.И., Касимов Н.С.* Геохимия ландшафта, М., Изд-во „Астрея-2000“, 768 с., 1999.
7. *Ревич Б.А., Авалиани С.Л., Тихонова Г.И.* Экологическая эпидемиология. М., Изд.- во центр „Академия“, 384 с., 2004.
8. *Саакян Л.В., Амирханян А.С.* Динамика концентраций тяжелых металлов как фактор изменения степени экологического риска. Материалы междунар. Молодеж. научн. конф. „Горные территории – экологические проблемы городов“, Ереван, РА, Изд-во ЦЭНИ НАН РА, с. 61-63, 2007.
9. *Сагателян А.К., Геворкян В.Ш., Аревшатян С.Г., Саакян Л.В.* Эколого-геохимическая оценка состояния окружающей среды города Каджарана. Ереван, Изд-во ЦЭНИ НАН РА, 200 с., 2008.
10. *Сусликов В.Л.* Геохимическая экология болезней, *2*, Атомовиты. М., Гелиос АРВ, 668 с., 2000.

11. *Amigou A., Sermage-Faure C., Orsi L., Leverger G., Baruchel A., Bertrand Y., Nelken B., Robert A., Michel G., Margueritte G., Perel Y., Mechinaud F., Bordigoni P., Hémon D., Clavel J.* Road traffic and childhood leukemia: the ESCALE study (SFCE). Environ. Health Perspect, Apr, *119*, 4, 566-572, 2011.
12. *Anderson L.M.* Environmental genotoxicants/carcinogens and childhood cancer: bridgeable gaps in scientific knowledge. Mutat Res., *608*, 2, 136-156, 2006.
13. *Asmaryan Sh.G., Sahakyan L.V.* Geo-ecological assessment of Yerevan's environment. Proceedings of the First International Applied Geological Congress, department of Geology. Islamic Azad University, Mashad-Campus, Iran, 26-28 April, 1822-1826, 2010.
14. *Bal W., Kasprzak K.S.* Induction of oxidative DNA damage by carcinogenic metals. Toxicol. Lett., *28*, 127(1-3), 55-62, 2002.
15. *Lagorio S., Forastiere F., Lipsett M., Menichini E.* Air pollution from traffic and the risk of tumors. Ann Ist Super Sanita, *36*, 3, 311-29, 2000.
16. *McBride M.L.* Childhood cancer and environmental contaminants. Canadian Journal of Public Health, *89*, (Suppl. 1), 53-68, 1998.
17. *Nyberg F., Gustavsson P., Jarup L., Bellander T., Berglind N., Jacobsson R. and others.* Urban air pollution and lung cancer in Stockholm. Epidemiology, 11, 487–95, 2000.
18. *Raaschou-Nielsen O., Andersen Z.J., Hvidberg M., Jensen S.S., Ketzel M., Sørensen M., Loft S., Overvad K., Tjønneland A.* Lung cancer incidence and long-term exposure to air pollution from traffic. Environ. Health Perspect, Jun; *119*, 6, 860-5, 2011.
19. *Saghatelyan A.K., Arevshatyan S.H., Sahakyan L.V.* Ecological-geochemical assessment of heavy metal pollution of the territory of Yerevan. New Electronic Journal of Natural Sciences, Yerevan, NAS RA, 36-41, 2003.
20. WHO and the International Programme on Chemical Safety. Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. Document WHO/PCS/EDC/02.2. Geneva, 2002.

Received on 08.04.2013

Հայաստանի Գիտությունների Ազգային Ակադեմիա
Национальная Академия Наук Армении
National Academy of Sciences of Armenia

Հայաստանի Կենսաբանական Հանդես
Биологический Журнал Армении
Biological Journal of Armenia

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

Biolog. Journal of Armenia, 3 (65), 2013

ANALYSIS OF ISOTHERMS WITH TWO BINDING SITES IN THE REGION OF SMALL FILLINGS

G.G. HOVHANNISYAN[1], V.B. ARAKELYAN[2], A.P. ANTONYAN[1], M.V. MINASYANTS[1], P.O. VARDEVANYAN[1]

[1]Yerevan State University, Department of Biophysics
[2]Yerevan State University, Department of Molecular Physics
biophys_dep@mail.ru

The adsorption isotherm of ligands on DNA in the region of small fillings which describes the isotherm with pronounced linear areas has been obtained in this research. It has been shown that experimental data description by such isotherm permits receiving not only more precise values of - both binding constant and number of adsorption centers with which one ligand molecule binds but also new parameter value-value of the portion of adsorption centers on DNA, having different constants of binding.

DNA – ligand – adsorption isotherm – small fillings – binding constant – number of adsorption centers

Աշխատանքում ստացվել է ԴՆԹ-ի հետ լիգանդների կապման կորը փոքր հագեցումների տիրույթում, որը նկարագրվում է երկու հստակ արտահայտված գծային տեղամասերով: Ցույց է տրվել, որ փորձարարական տվյալների նկարագրությունն այս կորի միջոցով հնարավորություն է ընձեռում ոչ միայն կապման հաստատունի և լիգանդի մեկ մոլեկուլի հետ կապվող կապման կենտրոնների թվի ավելի ճշգրիտ արժեքների ստացման համար, այլև նոր պարամետրի՝ ԴՆԹ-ի վրա տարբեր հաստատուններ ունեցող կապման կենտրոնների մասնաբաժնի արժեքի որոշման համար:

ԴՆԹ – լիգանդ – կապման կոր – փոքր հագեցումներ – կապման հաստատուն – կապման կենտրոնների թիվ

В работе получена изотерма адсорбции лигандов на ДНК в области малых заполнений, которая описывается с двумя ярко выраженными линейными участками. Показано, что описание экспериментальных данных такой изотермой позволяет не только получать более точные значения константы связывания и число адсорбционных центров, с которыми связывается одна молекула лиганда, но и определять значение нового параметра, доли адсорбционных центров на ДНК, имеющих разные константы связывания.

ДНК – лиганд – изотерма адсорбции – малые заполнения – константа связывания – число адсорбционных центров

The main processes of cell life ability are conditioned by interaction of different low molecular compounds – ligands with macromolecules: at first proteins and nucleic acids. This fact lies under the base of numerous studies on interaction of ligands with DNA by different experimental methods [1, 3, 7, 10-12, 14, 15]. Mostly of fully filled bound situation is not received due to weak binding of ligand to DNA as well as very small amount of adsorbing ligands. That is why the reasonable way of carrying out the experiment is the condition of small fillings when the ratio of molecules of ligands bound to DNA to number of base pairs of DNA is less from unit, in other word the estimation of adsorption

parameters within frame of simplified linear binding isotherm of ligands to DNA molecule [2,4,5]. It should be mentioned that small fillings permit not only describing adsorption process in relatively easy way but also having an independent interest. In vast majority of cases the filling of macromolecules by ligands may be considered to be small in conditions of real cellular system. Small fillings represent an interest due to the fact that the quantity of ligands on macromolecule in other equal conditions weakly excites the system and the obtained results describe the system adequately.

The statistic properties of such systems significantly differ from those when one adsorbed ligand takes one adsorption center [8, 9, 13, 16]. It should be noted that mostly ligands bind to DNA by several modes. This circumstance additionally complicates the analysis of experimental results. Despite adsorption isotherm has some characteristic peculiarities facilitating the processing of experimental isotherm analysis of binding of ligands to DNA, the problem of experimental data analysis of ligand binding to DNA may not be considered finally solved.

In the present work the adsorption isotherm of binding of ligands to DNA is obtained which describes all experimental points in single way (by one curve), i.e. describes experimental points that have two pronounced linear areas.

Theoretical part: It is known that in the region of small fillings the isotherm of Crothers-Gurskii may be approximated by line [9, 13]. Let's examine the case of binding of ligands to DNA when in the region of small fillings two types of centers of binding exist and ligand may bind independently to these adsorption centers. These centers are characterized by different binding parameters i.e. have different values of K binding constant and different number of n adsorption centers with that one ligand molecule binds. Therefore assuming that DNA molecule is characterized by two pairs of parameters – (K_1, n_1) and (K_2, n_2) the portion of adsorption centers on DNA that has binding parameters (K_2, n_2), should be indicated. Let's indicate this portion via p. It is obvious that the portion of adsorption centers on DNA that has (K_1, n_1) binding parameters will be equal to $q = 1 - p$. Let's represent DNA as one-dimensional crystal with N adsorption centers of binding and ligand having much less linear sizes at binding takes n adsorption centers on DNA disposed alternately. At first let's observe the case when one type of adsorption centers with (K, n) parameters exists on DNA. In this case the average number of bound ligands with DNA is x at small fillings, i.e. adsorption isotherm according to [2] is determined by formula:

$$x(t) = \frac{k_1 c_f N}{k_{-1} + (2n-1)k_1 c_f}, \qquad (1)$$

where k_1 and k_{-1} are rate constants of formation and dissociation of ligand complex with DNA, c_f – number of free ligands. If there are two types of adsorption centers on DNA with (K_1, n_1) and (K_2, n_2) binding parameters and they are filled independently the total number of adsorbed ligands on DNA will be:

$$x = \frac{K_1 c_f N_1}{1+(2n_1-1)K_1 c_f} + \frac{K_2 c_f N_2}{1+(2n_2-1)K_2 c_f}, \qquad (2)$$

where N_1 and N_2 are numbers of adsorption centers that are characterized by (K_1, n_1) and (K_2, n_2) binding parameters respectively, K_1 and K_2 – binding constants of ligands with adsorption centers of the first and the second types. To describe the experimental data let's rewrite (2) as:

$$1 = \frac{1-p}{Y+\alpha_1 X} + \frac{p\cdot\gamma}{Y+\alpha_2\gamma\cdot X}$$
$$Y = \frac{r}{K_1 c_f}, \quad X = r, \quad \gamma = \frac{K_2}{K_1} \qquad (3)$$
$$\alpha_1 = 2n_1 - 1, \quad \alpha_2 = 2n_2 - 1, \quad p = \frac{N_2}{N_1+N_2},$$

In formula (3) the "p" has the meaning of adsorption center portion on DNA that have K_2 binding constant and number of adsorption centers with which one ligand molecule binds is equal to n_2. Equation (3) gives the dependence of Y on X not clearly, that is actually the adsorption isotherm in Scatchard's coordinates. Comparing theoretical adsorption isotherm (3) with experimental data the values of n_1, K_1, n_2, K_2, p parameters may be determined. For comparison of theoretical adsorption isotherm (3) with experimental data, it is appropriate to represent (3) isotherm as:

$$\frac{r}{c_f} = K_1 \frac{1-\alpha_1 r - \alpha_2 \gamma r - p(1-\gamma)}{2} + \\ +K_1\sqrt{\frac{(1-\alpha_1 r - \alpha_2 \gamma r - p(1-\gamma))^2}{4} - \gamma r(\alpha_1\alpha_2 r - \alpha_2 - p(\alpha_1 - \alpha_2))}\,, \qquad (3a)$$

Results and Discussion. Let's apply above obtained theoretical results to experimental data analysis on isotherms of which two linear areas are clearly appeared. An example of such isotherm is represented on fig. 1.

If experimental binding isotherms of ligands to DNA have two pronounced linear areas it may be considered that these ligands bind to DNA at least by two modes. Through these experimental points two lines may be lined. The line with big slope angle corresponds to strong binding mode and the line with small slope angle corresponds to weak binding mode. In vast majority of cases the analysis of curve with pronounced linear areas is carried out in following way. Experimental linear areas of binding isotherm are compared with theoretical linear binding isotherm separately [2, 6].

$$\frac{r}{c_f} = K(1-(2n-1)r)\,, \qquad (4)$$

As a result of such comparison two important binding parameters – ligand binding constant to DNA K and number of adsorption centers on DNA n, with which one ligand molecule binds are determined by the least square method. The determined binding parameters for experimental points presented on fig. 1, are equal to $n_1 = 6$, $K_1 = 2 \times 10^6$ M^{-1}, $n_2 = 3.6$, $K_2 = 2.7 \times 10^5$ M^{-1} (for EtBr).

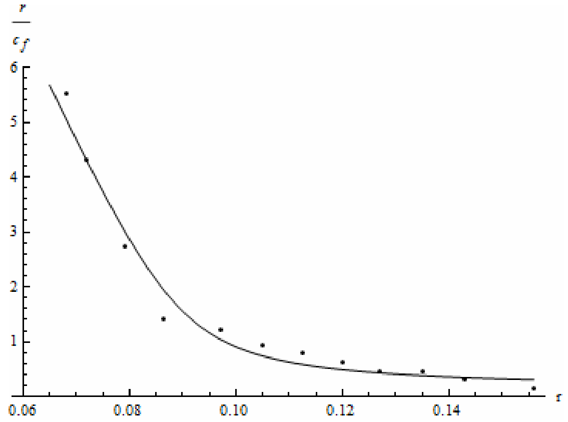


Fig.1. The binding curve of EtBr with DNA in Scatchard's coordinates. The binding curve is composed of two directly linear areas corresponding to two binding modes. Ionic strength of solution is 2×10^{-2}M. Points correspond to experimental data and curve is constructed by the least square method according to (3a) equation.

Moreover, this mode of binding isotherm analysis of ligands to DNA is approximated since the obtained experimental results artificially are divided into two groups and the analysis of each group is carried out separately. In each group only those experimental points remain that approximately are on the line. It is obvious that such mode of experimental data treatment for determination of binding parameters is incorrect. The more substantiated treatment mode of experimental data is that one, which would take all these data (i.e. experimental points). Experimental data analysis by new (3a) binding isotherm of ligands with DNA permits not only obtaining the precise values of K and n parameters but also determining new parameter value – the portion of adsorption centers of each type of p adsorption centers. It should be mentioned that theoretical binding isotherm comprises five varying parameters. This results in ambiguous determination of varying parameters. To obtain unique values of parameters let's fix several parameters hence their values practically are known for certain from both our and numerous literature data. Such parameters are $n_1 = 6$, $K_1 = 2 \times 10^6$ M^{-1}, for strong binding mode of EtBr to DNA. Giving values to these parameters the adsorption isotherm (3a) may be constructed along all experimental points by the least square method (fig. 1) and the values of $n_2 = 0.5$, $K_2 = 5.3 \times 10^5$ M^{-1}, $p = 0.025$ parameters may be determined. Comparing the values of K and n parameters obtained at experimental data description by one curve and two lines it is obvious that the value of n_2 is decreased about seven-times and K_2 is increased about two-times. It should be mentioned that the approximated description method of experimental data allows to determine the value of new parameter p, the portion of adsorption centers on DNA having K_2 binding constant that in our experiments is equal to $p = 0.025$.

REFERENCES

1. *Antonyan A.P., Davtyan A.G., Vardevanyan P.O.* Formation of semi-intercalatong complexes at EtBr binding to DNA. Scientific Reports YSU, (In Russian), 3, c. 97-102, 2003.
2. *Arakelyan V., Babayan Yu., Potikyan G.* Determination of constant rates of adsorption of ligand on DNA: Analysis of Correlation Functions. J. of Biomol. Struct. & Dyn., 18, 2, p. 231-235, 2000.
3. *Aroutyunyan S.G., Mamasakhlisov E.Sh., Morozov V.F., Dalyan Y.B., Khachikyan R.E., Vardevanyan P.O., Karapetian A.T., Orioli P., Bruni B.* Modification of DNA dimensional structure in the complex with cis-platine. Biophysics, (In Russian), 42, 2, c. 372-377, 1997.
4. *Babayan Yu.S., Manzini G., Xodo L.E., Quadrifoglio F.* Base specificity in the interaction of ethidium with synthetic polyribonucleotides. Nucleic Acids Res., *15*, 14, p. 5803-5813, 1987.
5. *Babayan Yu.S., Manzini O., Kuadrofolio F.* Interaction of ethidium bromide with synthetic double helix polyribonucleotides. Molecular Biology, (In Russian), *22*, 4, c. 989-910, 1988.
6. *Bloomenfeld V., Crothers D., Tinoco I.* Nucleic Acids. University Science Books Sausalito, California, 789 p., 1999.
7. *Borisova O.F., Shchelkina A.K., Karapetian A.T., Surovaya A.N.* Heterogeneity of ethidium bromide strong binding sites on DNA. Fluorescent and non fluorescent complexes. Molecular Biology, (In Russian), *32*, c. 855-862, 1998.
8. *Cantor Ch., Shimmel P.* Biophysical Chemistry. (In Russian), M., Mir, *3*, 534 p., 1985.
9. *Crothers D.M.* Calculation of binding isotherms for heterogeneous polymers. Biopolymers, *6*, p. 575-584, 1968.
10. *Dalyan E.B., Haroutiunyan T.S., Haroutiunyan S.G., Vardevanyan P.O.* Melting of complexes of DNA-*cis*-DDP in acidic environment. Exp. and Mol. Medicine, *35*, 6, p. 534-537, 2003.
11. *Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Manukyan G.A., Karapetian A.T., Shchelkina A.K., Borisova O.F.* Binding of ethidium bromide with native and denaturized poly(dA)-poly(dT). Mol. Biol., (In Russian), *34*, 2, c. 310-315, 2000.

12. *Minasyan S.G., Tavadyan L.A., Antonyan A.P., Davtyan H.G., Parsadanyan M.A., Vardevanyan P.O.* Differential pulse voltammetric studies of ethidium bromide binding with DNA. Bioelectrochemistry, *68*, p. 48-55, 2006.
13. *McGhee J.D., Von Hippel P.H.* Theoretical aspects of DNA-protein interactions: cooperative and noncooperative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice. J. Mol. Biol., *86*, p. 469-489, 1974.
14. *Tang T.Ch., Huang H.J.* Electrochemical studies of the intercalation of ethidium bromide to DNA. Electroanalysis, *11*, 16, p. 1185-1190, 1999.
15. *Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Davtyan H.G., Markaryan A.Sh., Kazaryan R.S., Babayan Yu.S.* Disperse of bound ligands method in study of adsorbtion isotherm. J. of Biomol. Struct. and Dyn., *20*, 6, p. 857, 2003.
16. *Zasedatelev A.S.,Gurskii G.V., Volkenstein M.V.* Theory of one-dimensional adsorption. Adsorption of small molecules on homopolymer. Mol. Biol., (In Russian), *5*, 2, c. 245-251, 1971.

Received on 09. 04.2013

Հայաստանի Գիտությունների Ազգային Ակադեմիա
Национальная Академия Наук Армении
National Academy of Sciences of Armenia

Հայաստանի Կենսաբանական Հանդես
Биологический Журнал Армении
Biological Journal of Armenia

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

Biolog. Journal of Armenia, 3 (65), 2013

COMPARATIVE DESCRIPTION OF PRODUCTIVITY AND CONTENT OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES OF SOME ESSENTIAL OIL-BEARING PLANTS IN CONDITIONS OF NEW WATER STREAM HYDROPONICS

S.KH. MAIRAPETYAN, M.KH. DARYADAR, J.S. ALEXANYAN,
A.H. TADEVOSYAN, A.H. TOVMASYAN, B.T. STEPANYAN,
H.M. GALSTYAN

G.S. Davtyan Institute of Hydroponics Problems NAS RA
hydrop@netsys.am.

The results of comparative growing of plants in the newest experimental modules of water stream (cylindrical, gully, continuous), classical hydroponics and soil culture have shown that cylindrical and classical hydroponics system provided the high productivity (1.8-2.7 times) of raw medicinal material of *Mentha piperita* L., at the same time increasing output of essential oil, extractive substances, flavanoids and tannins by 1.2-3.1 times. The cylindrical hydroponics promoted the high productivity (1.1-2.7 times) of raw medicinal material of *Ocimum basilicum* L., at the same time increasing the output of essential oil, extractive substances and flavanoids by 1.2-3.5 times.

Water stream hydroponics – peppermint – sweet basil – essential oil – productivity

Նորագույն ջրաշիթային հիդրոպոնիկայի փորձնական մոդուլներում /գլանային, ակոսային, համատարած/, դասական հիդրոպոնիկայի, ինչպես նաև հողային մշակույթի պայմաններում եթերայուղատու և դեղատու մշակաբույս պղպեղային դաղձի աճեցման համեմատական արդյունքները ցույց են տվել, որ գլանային հիդրոպոնիկական համակարգը և դասական հիդրոպոնիկան նպաստել են դեղահումքի արդյունավետության բարձրացմանը (1.8-2.7 անգամ), միաժամանակ, եթերայուղի, էքստրակտիվ նյութերի, ֆլավոնոիդների, դաբաղանյութերի ելքի մեծացմանը (1.2-3.1 անգամ): Բուրավետ ռեհանի դեպքում դեղահումքի արդյունավետության բարձրացմանը (1.1-2.7 անգամ) և եթերայուղի, էքստրակտիվ նյութերի, ֆլավոնոիդների ելքի (1.2-3.5 անգամ) մեծացմանը նպաստել է գլանային հիդրոպոնիկական համակարգը:

Ջրաշիթային հիդրոպոնիկա – պղպեղային դաղձ – բուրավետ ռեհան – եթերայուղ – արդյունավետություն

Сравнительные результаты культивирования эфиромасличного и лекарственного растения мяты перечной в условиях экспериментальных модулей новейшей струйной (цилиндрическая, бороздовая, сплошная) и классической гидропоники, а также почвы показали, что цилиндрическая и классическая гидропонические системы способствовали максимальному повышению продуктивности лекарственного сырья (1.8-2.7 раза), в то же время увеличению выхода эфирного масла, экстрактивных веществ, суммарных флавоноидов и дубильных веществ (1.2-3.1 раза). Цилиндрическая гидропоническая система способствовала обеспечению высокой продуктивности лекарственного сырья базилика душистого (1.1-2.7 раза), увеличению выхода эфирного масла, экстрактивных веществ и флавоноидов (1.2-3.5 раза).

Струйная гидропоника – мята перечная – базилик душистый – эфирное масло – продуктивность

In terms of rapid expansion of plants hydroponics production and considerable increasing demand for medicinal and essential oil-bearing plants which are considered very valuable in the world market, the development of their hydroponics biotechnologies has become an important and urgent issue. For that purpose in the result of many years' researches in the Institute of Hydroponics Problems NAS RA a new, modern system – "water-stream hydroponics" with polymeric film usage has been worked out and patented in 2006-2007 which is cheaper 5-6 times as compared to the existing classical hydroponicums with reinforced concrete plots [7-10]. This new systems allows to cultivate valuable plants by hydroponics method, providing an optimal air-water-heat-nutrient regime for normal growth and development of plants, increasing plant yield of a nourished unit square and minimizing the consumption of energy, water and nutrient elements. Application of irretrievable push of nutrient solution and closed ecological system allow excluding pollution of the environement, at the same time decreasing of the possibility of disease and insects outbreaks.

The aim of the investigation is comparative description of productivity, content and output of secondary bioactive substances of peppermint (*Mentha piperita* L.) and sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) in water-stream hydroponics (cylindrical, gully, continuous), classical hydroponics and soil conditions.

Materials and methods. The essential oil obtained from leaves and inflorescences of peppermint is rich in menthol alcohol (35-46%) and menthon ketone (9-26%). It is used for treating cardiovascular, respiratory, kidney, migraine and other diseases and in case of gastrointestinal diseases its leaves have a sedative, anti-inflammatory property at the same time lower blood pressure. The main compounds of essential oil obtained from sweet basil are methylchavicol (40-52%), linalool (20%) and geraniol (28%). The infusion from leaves and seeds is used for treating atherosclerosis, different ethological tumors, avitaminosis, spasm, gastrointestinal tract, cough, bronchial asthma, epilepsy, skin diseases and recovery of blood pressure. The essential oil is used in perfume, food and sweets production [5, 6, 11], (fig. 1).

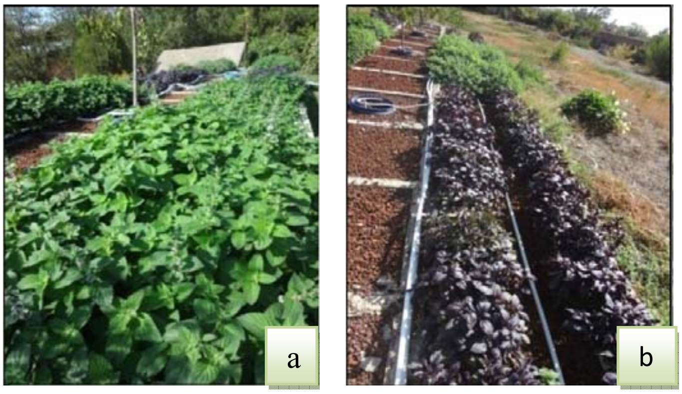


Figure 1. Peppermint (a) and Sweet basil (b) in water-stream hydroponics conditions

Davtyan nutrient solution (0.5-1.0N) was used in the experiments [2], which were pushed directly to the root-bearing stratum of the plant, in spring and autumn 6-8 and in summer 10-20 times a day, by duration 15-20 seconds. The dosage of the solution given once was 20-50 ml/plant. In classical hydroponics (CH) the plants were nourished 1-2 times a day and in soil (control) culture once in 3-4 days, 3-15mm diameter particle volcanic slag was used as substrate in hydroponics modules. The seedlings were planted 8 plant/m^2 planting density.

The content of essential oil was determined by Ginzberg's [4] method, flavonoids according to Borisov [1] and the content of extractive substances, tannins and moisture according to SPh XI [12]. The obtained results were submitted to mathematical working out [3].

Results and Discussion. Growth peculiarities and productivity indices of the studied plants in hydroponics and soil culture conditions is essentially different. This is due to certain regulation factors which provide the growth, development and productivity of plants in hydroponics.

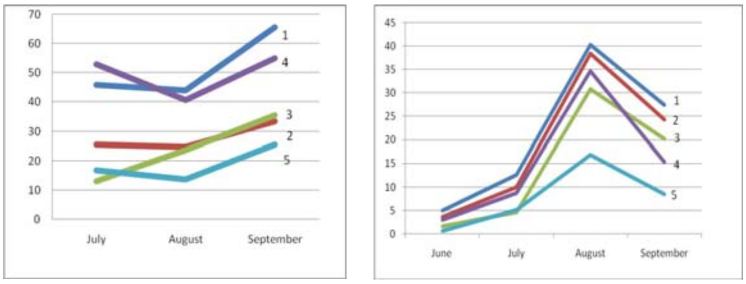
Table 1. Productivity of peppermint and sweet basil

Indices	Cylindrical	Gully	Continuous	CH	Soil (control)
	Peppermint				
Height of the plant, cm	52.4	47.8	46.5	65.1	41.8
Dry medicinal material's weight, g/plant, LED_{05}=15.3	155.0	83.7	69.7	149.0	57.0
Dry Stem's weight, g/plant	81.5	39.0	23.5	96.0	14.5
	Sweet basil				
Height of the plant, cm	56	41	46	52	45
Diameter of the stem base, mm	20	17	16	19	13
Dry medicinal material's weight, g/plant, LED_{05}=12.8	85.3	75.2	57.4	61.3	31.3
Dry stem's weight, g/plant	28.7	21.5	20.1	19.6	9.7
Dry root's weight, g/plant	16.1	16.3	10.6	10.4	4.1

It's obvious from analysis of tabl. 1 that the raw material of both peppermint and sweet basil obtained by using different hydroponics methods exceeds soil culture by 1.2-2.7 and 1.8-2.8 times. At the same time the obtained results have shown that cylindrical and classical hydroponics systems compared to gully, continuous and soil variants provided increase of raw material dry weight by 1.9-2.7 and 1.8-2.6 times. And in case of sweet basil cylindrical hydroponics system provided maximum productivity, which exceeded other variants 1.1-2.7 times.

The influence of cultivation conditions on the development of root system of sweet basil is also quite considerable. Cylindrical and gully hydroponics provided maximum growth of roots dry weight from the tested variants. We can conclude that in variants with maximum raw material there was also root mass weight increase by about 1.5-4.0 times (tab. 1).

At the same time, we can see from fig. 2 that during vegetation, regardless of cultivation conditions, peppermint provides maximum growth in September, while sweet basil reaches its maximum height in August and at the end of vegetation-in September it decreases.

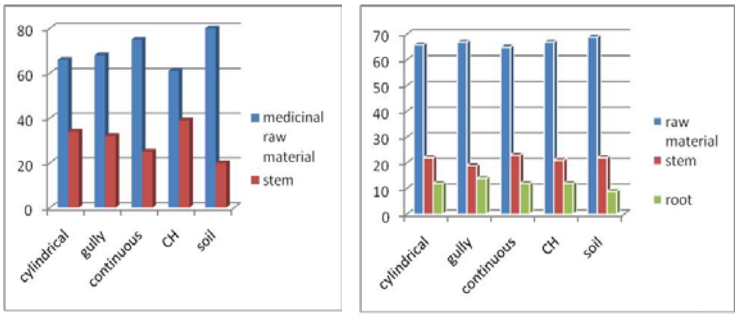


a) b)

1-Cylindrical, 2- Gully, 3- Continuous, 4- CH, 5-Soil

Figure 2. Peppermint (a) and Sweet basil (b) dry medicinal raw material weight by cuts, g/plant

In leaf-stem weight ratio the regularity confirmed in classical hydroponics and soil culture is mainly maintained in water-stream hydroponics modules. So by average value of 61-80 and 75-78% leaf mass accumulation has been observed in dry raw material of peppermint and sweet basil (fig. 3).



a) b)

Figure 3. Peppermint (a) and Sweet basil b) medicinal raw material-stem ratio in dry mass, %

It turned out from Pharmachemical analysis of raw material that growing conditions did not have any considerable influence on essential oil accumulation in the leaves of peppermint. By average data the indices fluctuated between 3.8-4.2% (tab. 2). However, during vegetation concerning the content of extractive substances, sum flavonoids and tannins there haven't been any certain regularities. Peppermint raw medicinal material (essential oil, humidity) meets the requirements of USSR SPh XI [7].

Table 2. The content and output of substances determining the pharmacological-chemical value of peppermint*

Variant	Essential oil		Extractive substances		Sum flavonoids		Tannins		Humidity
	%	g/plant	%	g/plant	%	g/plant	%	g/plant	%
Cylindrical	4.0	6.2	20.6	32.0	2.8	4.3	14.8	22.9	9.6
Gully	4.2	3.5	18.2	15.2	3.0	2.5	14.0	11.7	10.0
Continuous	3.9	2.7	20.2	14.1	3.2	2.2	14.3	10.0	9.7
CH	3.8	5.7	17.2	25.7	2.7	4.0	12.6	18.7	9.3
Soil (control)	4.1	2.3	18.1	10.3	3.3	1.9	14.6	8.3	10.6

**Average value of 3 cuts*

The study results of growth conditions influence on changes of pharmacological-chemical indices of sweet basil are summarized in tab. 3. From essential oil percentage content viewpoint the differences of cylindrical, gully hydroponics modules and soil culture are very little: according to average data it fluctuates between 0.74-0.78%.

In the experiments a greater amount of essential oils was provided by continuous hydroponics system (5-37%), while in classical hydroponics conditions that index considerably reduces, about 19-27%. Analyzing the data of the table we can see that the content of extractive substances and sum flavonoids is to some extent low only in case of gully hydroponics (by 27-31 and 13-28%). However, gully and continuous hydroponics systems provided a greater amount of tannins.

Table 3. The content and output of substances determining the pharmacological-chemical value of Sweet basil*

Variant	Essential oil		Extractive substances		Sum flavonoids		Tannins		Humidity
	%	g/plant	%	g/plant	%	g/plant	%	g/plant	%
Cylindrical	0.77	0.7	26.8	22.8	2.7	2.3	8.7	7.4	9.6
Gully	0.74	0.6	18.5	13.9	2.1	1.6	10.4	7.8	10.3
Continuous	0.82	0.5	26.2	15.1	2.4	1.4	10.8	6.2	10.2
CH	0.60	0.4	25.3	15.5	2.9	1.8	8.2	5.0	10.5
Soil (control)	0.78	0.2	26.3	8.2	2.4	0.8	8.6	2.7	11.0

**Average value of 3 cuts*

In the case of both tested plants the percentage content of bioactive substances: essential oils, extractive substances, flavonoids and tannins in soil variant is close to average indices of hydroponics plants, while the output of the above mentioned compounds reduces 1.2-3.1 (peppermint) and 1.7-3.5 (sweet basil) times. This is due to low harvest of soil plants.

The obtained data let us conclude that cylindrical hydroponics system and classical hydroponics promoted productivity increase of peppermint medicinal raw material (by 1.8-2.7 times), at the same time output increase of essential oils, extractive substances, flavonoids and tannins (by 1.2-3.1 times). Cylindrical hydroponics system promoted productivity increase of sweet basil medicinal raw material (by 1.1-2.7 times), at the same time output increase of essential oils, extractive substances and flavonoids (by 1.2-3.5 times).

REFERENCES

1. *Borisov M.I., Belikov V.V., Isakow T.I.* Quantitative content of flavonoids in Asperula L and Galium L. family plants. Plant resources, *3,* p. 351-358, 1975.
2. *Davtyan G.S.* Hydroponics. Reference book on chemicalization of agriculture. M., Kolos, 382-385, 1980.
3. *Dospechov B.A.* Field experiment method Moscow, Russia, 223-228, 1985.
4. *Ginzberg A.S.* Simplified method of determining the content of essential oil in essential oil-bearing plants. Chem.-pharm. Industry. #8-9, p 326-329, 1932.
5. *Lebedeva A.F., Jurenko N.I., Isaykina A.P and Sobko B.G.* Medicinal plants: the fullest encyclopedia. M.: AST-PRESS BOOK: 79-80, 2006.
6. Mairapetyan S.Kh.The culture of essential oil plants in open-air hydroponic conditions. Yerevan: publisher AH Arm SSR, 313, 1989.
7. *Mairapetyan S.Kh., Tadevosyan A.H., Hovsepyan A.H. and Mairapetyan Kh.S.* Method of soilless cultivation of planted crops and their implementation system, Invention Patent of RA, №1946, A2, 2007a.
8. *Mairapetyan S.Kh., Tadevosyan A.H., Hovsepyan A.H. and Mairapetyan Kh.S.* Method of soilless cultivation of plants and their implementation system, Invention Patent of RA, №1849 A2, 2006.
9. *Mairapetyan S.Kh., Tadevosyan A.H., Hovsepyan A.H. and Mairapetyan Kh.S.* Method of soilless cultivation of sowed herbs and their implementation system, Invention Patent of RA, №1988 A2, 2007 b.
10. *Mairapetyan S.Kh., Tadevosyan A.H., Hovsepyan A.H. and Mairapetyan Kh.S.* Method of soilless cultivation of herbs and their implementation system, Invention patent of RA, №1989, A2, 2007 c.
11. *Ozcan M., Chakchat J.-C.* Essential oil composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum minimum* L. in Turkey. Chech J. Food Sci., *20*, 6, 223-228, 2002.
12. State Pharmacopaea of USSR, *XI*, edition 2, Moscow, Medicine, 1990, www.fito.nnov.ru/pharmacopaea.

Received on 15.06.2013

Հայաստանի Գիտությունների Ազգային Ակադեմիա
Национальная Академия Наук Армении
National Academy of Sciences of Armenia

Հայաստանի Կենսաբանական Հանդես
Биологический Журнал Армении
Biological Journal of Armenia

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

Biolog. Journal of Armenia, 3 (65), 2013

IN VIVO ACTION OF CISPLATIN ON CONTENT OF NEUTRAL LIPIDS IN RAT LIVER AND THYMUS NUCLEAR MATRIX

E.S. GEVORGYAN, A.G. HOVHANISYAN, ZH. V. YAVROYAN, N.R. HAKOBYAN, G.B. GHUKASYAN

Yerevan State University, Department of Biophysics
gevorgyan_emil@yahoo.com

The content of total neutral lipid and its individual fractions in rat liver and thymus nuclear matrix preparations was studied. The in vivo action of antitumor agent cisplatin leads to decrease of total neutral lipid content in both liver and thymus nuclear matrix preparations by 24% and 15% respectively. Six fractions of neutral lipids were revealed in both liver and thymus nuclear matrix preparations. The relative content (the share) of all neutral lipid fractions is not changed reliably after the *in vivo* action of cisplatin in preparations of both liver and thymus nuclear matrix. At the same time the absolute quantities almost of all fractions in liver nuclear matrix are reliably changed while the absolute quantities only of free cholesterol and cholesterol esters changed reliably in thymus nuclear matrix preparation. These data demonstrate the high-powered action of cisplatin on nuclear lipid metabolic pathways.

Cisplatin – nuclear matrix – neutral lipids – cholesterol

Հետազոտվել է առնետի լյարդի և ուրցագեղձի բջիջների կորիզային մատրիքսի չեզոք լիպիդների բաղադրությունը հակաուռուցքային միացության՝ ցիսպլատինի *in vivo* ազդեցության տակ: Ցույց է տրված, որ ցիսպլատինն իջեցնում է չեզոք լիպիդների ընդհանուր քանակը 24%-ով լյարդի և 15%-ով ուրցագեղձի կորիզային մատրիքսի պատրաստուկներում: Չեզոք լիպիդների վեց ֆրակցիաներ են հայտնաբերվել ինչպես լյարդի, այնպես էլ ուրցագեղձի կորիզային մատրիքսում: Չեզոք լիպիդների բոլոր ֆրակցիաների հարաբերական բաժնեմասը կամ նրանց տոկոսային բաղադրությունը հավաստիորեն չեն փոփոխվում հետազոտված պատրաստուկներում: Միաժամանակ, լյարդի կորիզային մատրիքսի պատրաստուկներում գրեթե բոլոր ֆրակցիաների բացարձակ քանակները հավաստիորեն փոփոխվում են, այն դեպքում երբ ուրցագեղձի կորիզային մատրիքսում հավաստիորեն փոփոխվում են միայն խոլեստերինի և խոլեստերինի եթերների քանակները: Ստացված տվյալները վկայում են բջջակորիզի լիպիդների մատաբոլիզմի վրա ցիսպլատինի զգալի ազդեցության մասին:

Ցիսպլատին – կորիզային մատրիքս – չեզոք լիպիդներ – խոլեստերին

Изучено *in vivo* воздействие противоопухолевого препарата цисплатина на состав нейтральных липидов ядерного матрикса клеток печени и тимуса крыс. Показано, что цисплатин приводит к снижению количества тотальных нейтральных липидов в препаратах ядерного матрикса печени (на 24%) и тимуса (на 15%) крыс. Шесть фракций нейтральных липидов было выявлено в препаратах ядерного матрикса как печени, так и тимуса крыс. *In vivo* воздействие цисплатина не приводит к достоверному снижению относительного количества и процентного содержания выявленных фракций в обоих препаратах ядерного матрикса. Вместе с тем показано, что в препаратах ядерного матрикса печени абсолютное количество почти всех фракций нейтральных липидов достоверно снижается, в то время как в препаратах ядерного матрикса клеток тимуса крыс достоверно снижается только абсолютное количество холестерина и эфиров холестерина. Полученные данные свидетельствует о заметном воздействии цисплатина на внутриядерный метаболизм липидов

Цисплатин – ядерный матрикс – нейтральные липиды – холестерин

The nuclear matrix is a three-dimensional structure which is composed predominantly of non-histone proteins and small amounts of DNA, RNA, phospholipids and neutral lipids [10]. This nuclear skeleton-like structure plays important role in nucleus, such as in initiation of synthesis and replication of DNA and in synthesis, processing and transport of RNA [2,12]. Though lipids are the minor components of nuclear matrix they originally participate in principal nuclear events [3]. In this sense, the investigations of nuclear lipid metabolism are very essential. Lipid metabolic changes may be developed under the *in vivo* action of various exogenous agents. Cisplatin (cis-diammine-dichlorplatinum) is among them. It is well-known exogenous agent the main target of which is cell nucleus and which is clinically used as adjuvant therapy of cancers aiming inducing tumor cells death [8]. In this paper the changes in total neutral lipid content of nuclear matrix preparations from rat liver and thymus cells as well as the relative alterations in individual neutral lipids and absolute changes in their quantities after the *in vivo* action of cisplatin were described.

Materials and methods. The experiments were carried out on albino rats (120-150g weight). Cisplatin was injected peritoneal in concentration of 5 mg per 1000 g animal weight. Rats were decapitated after 24 hours of cisplatin injection. Rat liver nuclei were isolated by the method of Blober and Potter [7] and nuclear fraction of thymus – by the method of Allfrey et al [4]. Nuclear matrix preparations were isolated from purified nuclei by the method of Berezney and Coffey [5]. Lipid extraction was carried out by Bligh and Dayer [6]. The fractioning of neutral lipids was carried out by micro thin layer chromatography (micro TLC) using L silicagel, 6x9 sm^2 plates with the thickness of layer 5-7 mcm, using diethyl ester – petroleum ester – formic acid in ratio 40:10:1 as a dividing mixture. After the chromatography the plates were dried up at 20^0C and were treated by 10% H_2SO_4. Then, the elaborated plates were heated at 180^0C for 15 minutes. The quantitative estimation of separated and specific died phospholipids was carried out by special computer software FUGIFILM Science Lab 2001 Image Gauge V 4.0, which was destined for densitometry. Obtained results were treated by statistics.

Results and Discussion. Cisplatin injection to rats after 24 hours led to decrease in neutral lipids total amount both in rat liver (by 24% diminution of content) and thymus (by 15% diminution of content) nuclear matrix preparations (fig.1).

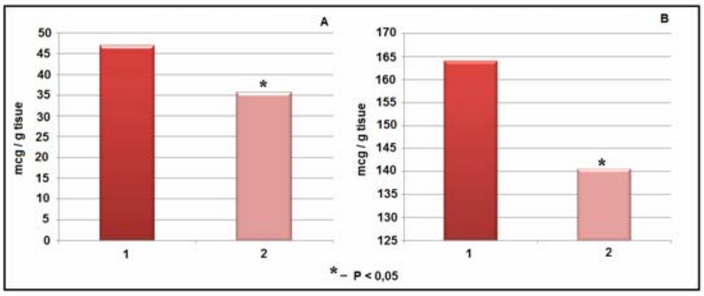


Figure 1. Neutral lipid content (in micrograms per grams of tissue) in nuclear matrix preparations of rat liver (A) and thymus (B) cells before (1) and after (2) the *in vivo* treatment of cisplatin.

The fractioning of neutral lipids disclosed six individual fractions both in liver and thymus nuclear matrix preparations (tabl. 1 and 2). Unlike phospholipids, the composition of neutral lipids of the nuclear matrix has been reported only in a few studies [1, 11, 12]. The relative content (the share) of all neutral lipid fractions is not reliably changed after the in vivo action of cisplatin both in preparations of liver and thymus nuclear matrix (tabl. 1 and 2).

Tabl. 1. The relative content (in micrograms) and percentage of individual neutral lipid fractions in nuclear matrix preparations of rat liver cells before and after the cisplatin action.

#	Neutral lipids	B a s e l i n e		C i s p l a t i n	
		Quantity in mcg	%	Quantity in mcg	%
1	Cholesterol	14.50±0.60	29.0	15.00±0.37	30.0
2	Cholesterol Esters	4.25±0.20	8.5	4.00±0.24	8.0
3	Free Fatty Acids	12.00±0.65	24.0	11.50±0.47	23.0
4	Monoglycerides	5,25±0.32	10.5	6.00±0.35	12.8
5	Diglycerides	5,00±0.16	10.0	5.50±0.38	10.2
6	Triglycerides	9.00±0.80	18.0	8.00±0.48	16.0
	T o t a l	50	100	50	100

*p<0,05

Tabl. 2. The relative content (in micrograms) and percentage of individual neutral lipids fractions in nuclear matrix preparations of rat thymus cells before and after the cisplatin action

#	Neutral lipids	B a s e l i n e		C i s p l a t i n	
		Quantity in mcg	%	Quantity in mcg	%
1	Cholesterol	21.60±0.72	43.2	9.00±0.50	38.0
2	Cholesterol Esters	5.00±0.49	10.0	4.80±0.23	9.6
3	Free Fatty Acids	7.70±0.50	15.4	8.50±0.15	17.0
4	Monoglycerides	7.40±0.59	14.8	8.35±0.14	16.7
5	Diglycerides	5.50±0.50	11.0	6.30±0.24	12.6
6	Triglycerides	2.80±0.30	5.6	3.05±0.30	6.1
	T o t a l	50	100	50	100

*p<0,05

Taking into consideration that *in vivo* administration of cisplatin leads to reliable decrease in total neutral lipids content in both rat liver and rat thymus nuclear matrix preparations by 24% and 15% respectively (fig.1) the necessity arises to determine the changes in absolute quantities of individual neutral lipids after cisplatin action. The absolute quantities of almost all fractions of neutral lipids in liver nuclear matrix preparations were decreased reliably (tabl. 3 and 4).

Tabl. 3. The quantities (in micrograms per gram of tissue) of individual neutral lipids fractions in nuclear matrix preparations of rat thymus and liver cells before and after the cisplatin action (CH – cholesterol; CHE – cholesterol esters; FFA – free fatty acids; MG – monoglycerides, DG – diglycerides, TG – triglycerides)

#	Neutral lipids	Liver Nuclear Matrix		Thymus Nuclear Matrix	
		Baseline	Cisplatin	Baseline	Cisplatin
1	CH	13.63±0.49	*10.71±0.18	70 .80±2.60	*53.20±0.91
2	CHE	4.00±0.14	*2.86±0.12	16.40±0.58	*13.48±0.26
3	FFA	11.28±0.40	*8.21±0.35	25.26±0.89	23.80±0.41
4	MG	4.94±0.18	4.58±0.18	24.32±0.75	23.38±0.40
5	DG	4.70±0.17	*3.63±0.16	18.04±0.63	17.64±0.30
6	TG	8.45±0.30	*5.71±0.24	9.18±0.32	8.50±0.12
	T o t a l	47.00±1.68	*35,70±1.50	164.00±5.77	*140.00±2.40

*p<0,05

These results are consonant with our previous data obtained in studies of changes in neutral lipids content in rat liver and thymus chromatin after the cisplatin in vivo action. In those studies the quantities in all four neutral lipid fractions in liver chromatin preparations were also decreased [9].

Tabl. 4. The alteration (in percent) in individual phospholipid quantities in liver and thymus nuclear matrix preparations under the cisplatin *in vivo* action

#	Neutral lipids	Liver Nuclear Matrix	Thymus Nuclear Matrix
1	Cholesterol	- 21.4%	- 24.9%
2	Cholesterol esters	- 28.5%	- 17.8%
3	Free Fatty Acids	- 27.2%	- 5.8%
4	Monoglycerides	- 7.3%	- 3.9%
5	Diglycerides	- 22.3%	- 2.2%
6	Triglycerides	- 32.4%	- 7.4%
	T o t a l	- 24.0%	- 14.6%

Taking into consideration that cisplatin treatment decreased the total amount in neutral lipids in thymus nuclear matrix by less than 15%, the reliable diminution in absolute quantities was expressed only in free cholesterol and cholesterol esters fractions (Tables 3 and 4). Thus, the obtained data demonstrate the noticeable action of cisplatin on nuclear lipid metabolic pathways.

REFERENCES

1. *Геворкян Э.С., Явроян Ж.В., Паносян Г.А.* Липидный состав ядерного матрикса печени крыс при воздействии гидрокортизона. Бюлл. экспер. биол. мед., *8*, 171-174, 1987.
2. *Albi E., Lazzarini A., Lazzarini R., Floridi A., Damaskopoulou E., CurcioF., Cataldi S.* Nuclear lipid microdomain as place of interaction between sphingomyelin and DNA during liver regeneration. Int. J. Mol. Sci., *14*, 6529-6541, 2013.
3. *Albi E., Villani M.* Nuclear lipid microdomains regulate cell function. Communicative and Integrative Biology, *2*, 1, 23-24, 2009.
4. *Allfrey V.G., Mirsky A.E., Osawa S.* The protein synthesis in isolated cell nucleus. Gen. Physiol., *40*, 3, p. 451, 1957.
5. *Berezney R., Coffey D.S.* The nuclear protein matrix: Isolation, structure and functions. Adv. Enzyme Regul., *14*, 63-100, 1976.
6. *Bligh E.G., Dyer W.J.* A rapid method of total lipid extraction and purification // Canadian Biochem. Physiol., *37*, pp. 911-917, 1959.
7. *Blobel G., Potter V.R.* Nuclei from rat liver: Isolation method that combines purity with high yield. Science, *154*, 76-79, 1966.
8. *Florea A.-M., Busselberg D.,* Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. Cancers, *3*, 1351-1371, 2011.
9. *Gevorgyan E.S., Hovhanisyan A.G.,Yavroyan Zh.V., Hakobyan N.R.* Content of neutral lipids in rat liver and thymus chromatin under the *in vivo* action of cisplatin. Biol.Journal of Armenia, *64*, 3, 97-101, 2012.
10. *Samuel Sh.K., Spencer V.A., Bajno L., Sun J.-M., Holth L.T., Oesterreich S., Davie J.R. In Situ* cross-linking by cisplatin of nuclear matrix-bound transcription factors to Nuclear DNA of human breast cancer cells. Cancer Research, *58*, 3004-3008, 1998.
11. Struchkov V.A., Strazhevskaya N.B. DNA-binding lipids:composition and possible functions. Biochemistry (Moscow), *58*, 1154-1174, 1993.
12. *Struchkov V.A., Strazhevskaya N.B.,* Structural and functional aspects of nuclear lipids in normal and tumor cells. Biochemistry (Moscow), *65*, 5, 620-643, 2000.

Received on 25.03.2013

Հայաստանի Գիտությունների Ազգային Ակադեմիա
Национальная Академия Наук Армении
National Academy of Sciences of Armenia

Հայաստանի Կենսաբանական Հանդես
Биологический Журнал Армении
Biological Journal of Armenia

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

Biolog. Journal of Armenia, 3 (65), 2013

THE EFFECTS OF LOW-INTENSITY ELECTROMAGNETIC IRRADIATION AT THE FREQUENCIES OF 51.8 AND 53 GHZ AND ANTIBIOTIC CEFTAZIDIME ON *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* F_0F_1 ATP-ASE ACTIVITY

D.R. SOGHOMONYAN

Yerevan State University, Department of Biophysics
d.soghomonyan@ysu.am

The effects of low intensity electromagnetic irradiation (EMI) at the frequencies 51.8 and 53 GHz and antibiotic ceftazidime on N,N'-dicyclohexilcarbodiimide (DCCD), inhibited ATP-ase activity of *Lactobacillus acidophilus* membrane vesicles were investigated. It was shown that both frequencies decreased the ATP-ase activity, moreover, ceftazidime increase the sensitivity of cells to DCCD, inhibitor of the F_0F_1-ATP-ase. EMI combined with ceftazidime and DCCD markedly decreased the ATP-ase activity. The F_0F_1-ATP-ase is suggested can be a target for the effects observed.

L. acidophilus – electromagnetic irradiation – ATPase activity

Ուսումնասիրվել է ցածր ուժգնությամբ, 51,8 և 53 ԳՀց հաճախականությամբ էլեկտրամագնիսական ալիքների և հակաբիոտիկ ցեֆտազիդիմի ազդեցությունը *Lactobacillus acidophilus* կաթնաթթվային բակտերիաների թաղանթային բշտիկների N,N'-դիցիկլոհեքսիլկարբոդիիմիդի (ԴՑԿԴ) նկատմամբ զգայուն ԱԵՖ-ազային ակտիվության վրա: Ցույց է տրվել, որ երկու հաճախությունններն էլ ճնշում են ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը, ավելին՝ ցեֆտազիդիմը մեծացնում է ԴՑԿԴ-ի՝ F_0F_1-ԱԵՖ-ազի արգելակչի նկատմամբ բջիջների զգայնությունը, իսկ էլեկտրամագնիսական ալիքների, ցեֆտազիդիմի և ԴՑԿԴ-ի զուգակցումը զգալիորեն ճնշում է ԱԵՖ-ազային ակտիվությունը: Ենթադրվում է, որ F_0F_1-ԱԵՖ-ազը դիտարկված ազդեցությունների թիրախ է:

L. acidophilus – էլեկտրամագնիսական ճառագայթում – ԱԵՖազային ակտիվություն

Было изучено влияние низкоинтенсивных электромагнитных волн с частотами 51,8 и 53 ГГц и антибиотика цефтазидима на N,N'-дициклогексилкарбодиимид (ДЦКД) чувствительную АТФ-азную активность мембранных везикул молочнокислых бактерий *Lactobacillus acidophilus*. Было показано, что обе частоты снижают АТФ-азную активность, более того, цефтазидим повышает чувствительность клеток к ДЦКД, ингибитору F_0F_1-АТФ-азы, а комбинированное действие цефтазидима, электромагнитных волн и ДЦКД значительно снижает АТФ-азную активность. Предполагается, что F_0F_1-АТФ-аза является мишенью наблюдаемых эффектов.

L. acidophilus – электромагнитное излучение – АТФ-азная активность

The lactic acid bacteria (LAB) are arguably the second only to yeast in importance in their service to human. They have been used worldwide in the generation of safe, storable and organoleptically pleasing foodstuffs [1]. One of the well-known LAB species is a probiotic culture *Lactobacillus acidophilus*.

LAB are confronted with several challenges such as electromagnetic irradiation (EMI) effects and influence of chemicals including different antibiotics. The bacterial effects of extremely high frequency electromagnetic irradiation (EMI) with low (low-energetic) intensity and non-thermal action are interesting due to that extremely high

frequency EMI is widely applied in therapeutic practice, food and wine preservation [2]. Recently it has been shown that there are two frequencies of EMI – 51.8 and 53 GHz which can affect these bacteria [3]. Different cellular targets are suggested to explain the effects of EMI–water molecules, plasma membrane and genome [4, 5, 6]. Among membrane components the *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) sensitive H^+-translocating F_0F_1-ATP-ase, the key enzyme of bioenergetics means, might be a target for EMI and some antibiotics [7]. The direct effects on this ATP-ase can disturb proton motive force generation and pH homeostasis maintaining to enhance cellular effects of those factors. However these effects should be further studied.

In our work we have investigated the effects of EMI and ceftazidime on DCCD inhibited ATPase activity of *Lactobacillus acidophilus* membrane vesicles.

Materials and methods. VKMB-1660 wild type strain was used for all experiments. These bacteria were grown in MRS broth (pH 6.5) [3,8]. The bacteria were grown at 37^0C until stationary growth phase (20-24 h) under anaerobic conditions upon fermentation of glucose (20 g/ l) [3, 9]. Cells grown were concentrated by centrifugation (3,600×g) during 15 min, washed and diluted in bi-distilled water. Then, the bacterial suspension (at the concentration of 107-108 colony-forming units (CFU)/ml) was transferred into the plastic plate (Petri dish) with suspension thickness of 1 mm for subsequent irradiation during 1 h as described elsewhere [5, 7, 9]. The latter was performed by EMI generator; model G4-141 (State Scientific-Production Enterprise "Istok", Fryazino, Moscow Region, Russia) radiating (with conical antenna) the coherent in time electromagnetic waves with the frequencies of 51.8 GHz and 53 GHz in the option of amplitude modulation with frequency of 1 Hz (frequency stability was 0.05%); the flux capacity was of 0.06 mW/cm^2 [3, 7]. The generator was assembled at the Institute of Radiophysics and Electronics, the National Academy of Sciences of Armenia, and supplied by Kalantaryan. Membrane vesicles were isolated from cells as described [7]. ATPase activity was determined by amount of liberated inorganic phosphate (Pi) after adding 5 mM ATP by Taussky and Shorr method [13]. The corrections were made for blanks without ATP or membrane vesicles. Relative ATP-ase activity was expressed in nmol Pi per mg protein in 1 min. The assay mixture contains 50 mM Tris– HCl (pH 6.5), 0.4 mM $MgSO_4$ and 100 mM KCl When it was necessary, membrane vesicles were preincubated with ceftazidime (20 □M) or DCCD (0.01 mM) for 10 min. Average data from triple measurements were represented with standard errors determined as before [3, 7, 9, 10].

Results and Discussion. As shown before [3], 51.8 and 53 GHz EMI has strong anti-bacterial effects on *L. acidophilus* and enhanced the effect of ceftazidime on their growth and survival. Moreover, EMI has effects on H^+ fluxes across the membrane [3, 7]. EMI at the frequencies both did not change overall energy (glucose)-dependent H^+ effluxes across the membrane, but it increased DCCD-inhibited H^+ efflux. In contrast to this, EMI in combination with ceftazidime decreased DCCD-sensitive H^+ effluxes [3]. So it was suggested that H^+-translocating F_0F_1-ATP-ase, for which DCCD is specific inhibitor [7, 10], might be a target for EMI and ceftazidime. Indeed, EMI at the frequencies 51.8 and 53 GHz suppressed the overall ATP-ase activity of *L. acidophilus* membrane vesicles 1.3 fold and 2.6 fold, respectively. The suppression was more considerable in the presence of DCCD (0.01 mM) – 2.18 fold and 4.4 fold, respectively (fig.1). In case of combination EMI at both frequencies with ceftazidime (20 μM) the inhibition of ATP-ase activity was much more expressed, especially in the presence of DCCD – 3.3 fold and 7.5 fold, respectively (fig. 2).

We had determined the DCCD sensitive ATPase activity had been calculated from parallel measurements (tabl.1): a significant decrease in DCCD-inhibited ATP-ase activity of *L. acidophilus* membrane vesicles after exposure of bacteria with EMI at the frequency of 51.8 or 53 GHz was determined in the absence and in the presence of ceftazidime. These data confirm a target role of F_0F_1 in bacterial action of EMI. Moreover, EMI at the frequency 53 GHz was stronger to suppress the DCCD-inhibited ATP-ase activity (tabl. 1). The results obtained in the presence of ceftazidime indicated that EMI enhanced the effect of cefta zidime.

The changes in the F_0F_1-ATPase activity point out the membranous effects of low intensity extremely high frequency EMI on bacteria. They are likely to those with the other bacteria [14] as well as to the effects on lipid bilayers changing membrane permeability [13].

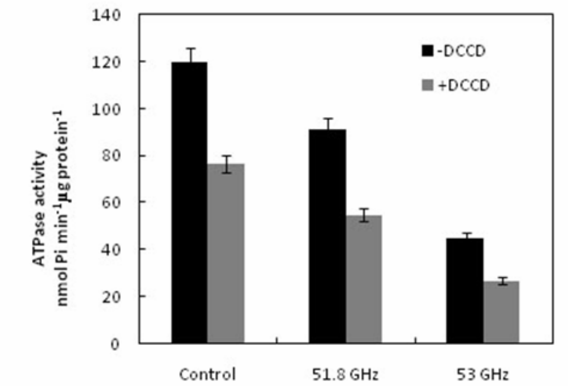


Fig. 1. The effects of 51.8 and 53 GHz frequencies EMI and DCCD on overall ATPase activity of *L. acidophilus* membrane vesicles. Control was without irradiation; 0.01 mM DCCD was added when mentioned. For the others, see "*Materials and Methods*"' section

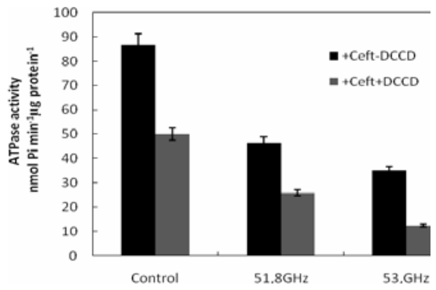


Fig. 2. The effects of 51.8 and 53 GHz frequencies EMI and DCCD on overall ATPase activity of *L. acidophilus* membrane vesicles in the presence of ceftazidime (20 µM). For the others, see legends to fig. 1.

Tabl. 1. DCCD sensitive ATPase activity of *L. acidophilus* membrane vesicles under 51.8 and 53 GHz frequencies EMI and in the presence of ceftazidime.

Antibiotic Ceftazidime (20µM)	ATPase activity (nmol P_i/min/µg protein)		
-	Control	51.8 GHz	53 GHz
+	43,5±2,2	36,5±2,0	18,0±1,1
	37,0±2,0	20,5±1,3	22,5±1,4

Thus, in addition to inhibitory effects on *L. acidophilus* growth and survival and H^+ fluxes across the membrane [3], EMI at 51.8 and 53 GHz frequencies enforced the influence of antibiotic ceftazidime on DCCD-inhibited ATPase activity. It might be suggested that EMI combined with ceftazidime can cause conformational changes in F_0F_1 and lead to decrease in its activity. These effects are of interest and could be applied in biotechnology, when LAB are used in different paths.

REFERENCES

1. *Chen X, Sun Z, Meng H. and Zhang H.* The acid tolerance association with expression of H^+-ATPase in Lactobacillus casei. Int. J. Dairy Technol., *62*, 272-276, 2009.
2. *Geveke D.J, Gurtler J. and Zhang H.Q.* Inactivation of Lactobacillus plantarum in apple cider, using radio frequency electric fields. J. Food Protection, *72*, 656–661, 2009.
3. *Soghomonyan D. and Trchounian A.* Comparable effects of low-intensity electromagnetic irradiation at the frequency of 51.8 and 53 GHz and antibiotic ceftazidime on *Lactobacillus acidophilus* growth and survival. Cell Biochem. Biophys. E-pub Mar 21; DOI: 10.1007/s12013-013-9571-2, .,
4. *Trchounian, A., Ogandzhanyan, E., Sarkisyan, E., Gonyan, S.,Oganesyan, A., & Oganesyan, S.* Membranotropic effects of electromagnetic radiation of extremely high frequency in Escherichia coli. Biophysics, *46*, 69-76, 2001.
5. *Tadevosyan, H., Kalantaryan, V., & Trchounian, A.* The effects of electromagnetic radiation of extremely high frequency and low intensity on the growth rate of *Escherichia coli* and the role of medium pH. Biophysics, *52*, 893-898, 2007.
6. *Betskii, O.V., Devyatkov, N.D., & Kislov, V.V.* Low intensity millimeter waves in medicine and biology. Critical Reviews in Biomedical Engineering, *28*, 247-268, 2000.
7. *Tadevosyan H., Kalantaryan V. and Trchounian A.* Extremely high frequency electromagnetic radiation enforces bacterial effects of inhibitors and antibiotics. Cell Biochem. Biophys., *51*, 97-103, 2008.
8. *De Man J., Rogosa and Sharpe M.E.* A medium for the cultivation of lactobacilli. J. Appl. Bacteriol., *23*, 130-135, 1960.
9. *Soghomonyan D., Akopyan K, & Trchounian A.* pH and oxidation–reduction potential change of environment during growth of lactic acid bacteria: Effects of oxidizers and reducers. Appl. Biochem. Microbiol., *47*, 27-31, 2011.
10. *Trchounian, A., Ohandjanyan, E., Bagramyan, K., Vardanyan, V., Zakharyan, E., Vassilian, A., et al.* Relationship of the *Escherichia coli* TrkA system of potassium ion uptake with the F_0F_1-ATPase under growth conditions without anaerobic or aerobic respiration. Bioscience Reports, *18*, 143–154,1998.
11. *Torgomyan H. and Trchounian A.* Bactericidal effects of low-intensity extremely high frequency electromagnetic field: An overview with phenomenon, mechanisms, targets and consequences. Crit. Rev. Microbiol., *39*, 102-111, 2013.
12. *Torgomyan H., Kalantaryan V. and Trchounian A.* Low intensity electromagnetic irradiation with 70.6 and 73 GHz frequencies affects *Escherichia coli* growth and changes water properties. Cell Biochem. Biophys., *60*, 275–281, 2011.
13. *Taussky H. and Shorr E.* A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus, J. Biol. Chem., *202*, 675-685, 1953.
14. *Bulgakova, V.G., Grushina, V.A., Orlova, T.I., Petrykina, Z.M., Polin, A.N., Noks, P.P., et al.* The effect of millimeter-band radiation of non-thermal intensity on sensitivity of *Staphylococcus* to various antibiotics. Biophysics, *41*, 1289-1293, 1996.

Received on 25.03.2013

Հայաստանի Գիտությունների Ազգային Ակադեմիա
Национальная Академия Наук Армении
National Academy of Sciences of Armenia

Հայաստանի Կենսաբանական Հանդես
Биологический Журнал Армении
Biological Journal of Armenia

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

Յայաստանի կենսաբ. հանդես, 3(65), 2013

ՆՈՐ ՄԵԿՈՒՍԱՑՎԱԾ ՋԵՐՄԱԿԱՅՈՒՆ *LEPTOSPIRILLUM* SPP. ԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ԱԴՀԵԶԻԱՆ ԵՎ ՊԻՐԻՏԻ ԿԵՆՍԱՏԱՐՐԱԼՎԱՑՈՒՄԸ

Ա.Կ. ՎԱՐԴԱՆՅԱՆ

ՀՀ ԳԱԱ ,Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ, Միկրոբիոլոգիայի ինստիտուտ
avivardan@gmail.com

Ցինկի խտահումքի տարրալվացման պուլպից մեկուսացված *Leptospirillum* sp. ZC շտամն ընդունակ է օքսիդացնելու Fe (II) 30-40 ^{0}C ջերմաստիճանային միջակայքում: Ցույց է տրվել, որ համատեղ աճեցումը ծծումբ օքսիդացնող *Acidithiobacillus albertensis* շտ. SO-2-ի հետ խթանում է *Leptospirillum* sp. շտ. ZC-ի ադհեզիան պիրիտի մակերեսին և զգալիորեն բարձրացնում ապարի տարրալվացման ինտենսիվությունը: Պարզվել է, որ խառը կուլտուրայի դեպքում *Leptospirillum* sp. շտ. ZC-ի բջիջներն ադհեզվում են պիրիտի մակերեսին միայն ծծումբ օքսիդացնող բակտերիաների կողմից նրա նախնական զաղութացումից հետո: Բացահայտվել է կոռելյացիա պիրիտի կենսաօքսիդացման և ապարի մակերեսին *Leptospirillum* spp. բակտերիաների ադհեզիայի գործընթացների միջև: Ենթադրվում է, որ *Leptospirillum* spp. բակտերիաների կողմից պիրիտի տարրալվացումը տեղի է ունենում անուղղակի կոնտակտային մեխանիզմով:

Leptospirillum spp. բակտերիաներ – պիրիտի կենսաօքսիդացում – բակտերիների ադհեզիա

Leptospirillum sp. штамм ZC, изолированый из пульпы выщелачивания цинкового концентрата, способен окислять Fe (II) в диапазоне температур 30-40 ^{0}C. Показано, что совместное культивирование с сероокисляющей бактерией *Acidithiobacillus albertensis* str. SO-2 способствует адгезии *Leptospirillum* sp. шт. ZC на пирите и значительно повышает эффективность его биовыщелачивания. Установлено, что в смешанной культуре клетки *Leptospirillum* sp. шт. ZC адгезируются на поверхности пирита только после его начальной колонизации сероокисляющими бактериями. Выявлена корреляция между биоокислением пирита и адгезией бактерий *Leptospirillum* spp. на поверхности минерала. Предполагается, что выщелачивание пирита бактериями *Leptospirillum* происходит по непрямому контактному механизму.

Бактерии Leptospirillum spp. – адгезия на пирите – биоокисление пирита

Leptospirillum sp. str.ZC isolated from bioleaching pulp of zinc concentrate is capable of oxidizing Fe (II) in the range of temperatures 30-40^{0}C. It has been shown that the growth of *Leptospirillum* sp. str. ZC together with sulfur oxidizing *Acidithiobacillus albertensis* str.SO-2 promotes its adhesion on pyrite and significantly enhances the efficiency of pyrite bioleaching. It has been revealed that in case of mixed culture the cells of *Leptospirillum* sp. str. ZC are adhered on pyrite surface only after its initial colonization by sulfur oxidizing bacteria. The correlation between pyrite biooxidation and adhesion of *Leptospirillum* spp. bacteria on mineral surface has been found. It is supposed that bioleaching of pyrite by *Leptospirillum* spp. bacteria occurs by means of indirect contact leaching.

Leptospirillum spp. bacteria – bacterial adhesion pyrite – pyrite biooxidation

Կենսաօքսիդացումը բակտերիաների միջոցով սուլֆիդային ապարների նախամշակման գործընթաց է, որի ընթացքում քայքայվում է պիրիտի կամ արսենապիրիտի բյուրեղավանդակը, ազատվում դրանցում ներփակված ոսկին և մատչելի դառնում հետագա կորզման համար ցիանացման եղանակով [7]: Վերջին տարիների հետազոտությունները վկայում են, որ 40^{0}C-ում գործող ոսկի-արսենապիրիտային և պիրիտային հանքաքարերի կենսաօքսիդացման արտադրական ռեակտորներում գերա- կշռող երկաթ օքսիդացնող բակտերիաները *Leptospirillum* spp. (հիմնականում *Leptospiril - lum ferriphilum*)

բակտերիաներն են [6, 14, 17, 22]: Բարձր Fe^{3+}/Fe^{2+} հարաբերությունը, բարձր ջերմաս-տիճանը (40^{0}C), ինչպես նաև pH-ի ծայրահեղ ցածր արժեքները (pH 1,0) առավել նպաստավոր են այդ ցեղի բակտերիաների կենսագործունեության համար [10, 18]: *Leptospirillum* ցեղը ընդգրկում է *L. ferrooxidans* (I խումբ), *L. Ferriphilum* (II խումբ) և *L. ferrodiazotrophum* (III խումբ) տեսակները: Լեպտոսպիրիլները գրամբացասական, ացիդոֆիլ, ծռված ձողիկներ են, խիստ քեմոլիթոավտոտրոֆ, որոնք ֆիքսում են ածխաթթու գազը՝ օգտագործելով Fe (II)-ի օքսիդացման էներգիան [2, 5, 6,12]:

Վերջին շրջանում գիտնականները 40^{0}C-ից բարձր ջերմաստիճանի պայմաններում ընթացող ապարների կենսաօքսիդացման և կենսատարրալվացման գործընթացներում առանձնապես կարևորում են *Leptospirillum* ցեղի տեսակները և նրանց խառը կուլտուրաներն այլ բակտերիաների հետ [2, 9, 16, 21]:

Սուլֆիդային ապարների կենսաօքսիդացման կամ կենսատարրալվացման անհրաժեշտ պայման է բակտերիաների կողմից կենսաթաղանթի առաջացումը՝ որպես բակտերիաապար փոխազդեցության ձև [19, 22]: Կենսաթաղանթի արտաբջջային պոլիմերային նյութերը միջնորդավորում են բջիջների ամրացումը ապարին, ինչպես նաև կենսատարրալվացման գործընթացում ապարի մակերեսին ընթացող էլեկտրաքիմիա-կան ռեակցիաները [15, 20]: Սակայն *Leptospirillum* spp. բակտե-րիաների ադհեզիայի և ապարների տարրալվացման գործընթացի համահարաբերակցության վերաբերյալ քիչ տվյալներ կան:

Ցինկի խտահումքի տարրալվացման պուլպից մեկուսացվել է *Leptospirillum* spp. բակտերիա, որն ընդունակ է օքսիդացնելու Fe (II)՝ 30-40^{0}C ջերմաստիճանային միջակայքում:

Աշխատանքի նպատակն է եղել ուսումնասիրել մեկուսացված *Leptospirillum* sp. բակտերիայի կենսաբանական առանձնահատկությունները և ադհեզիայի ընդունակությունը կապված պիրիտի կենսաօքսիդացման հետ:

Նյութ և մեթոդ: <u>*Leptospirillum* spp. բակտերիաների մեկուսացումը</u>: *Leptospirillum* spp. բակտե-րիաների մեկուսացման նպատակով 9K սննդամիջավայրը վարակվել է ցինկի տարրալվացման պուլպի նմուշով և ինկուբացվել 7-10 օրվա ընթացքում 37^{0}C-ի պայմաններում [1]:

Մաքուր կուլտուրաները ստացվել են Մաննինգի [1] և $FeTSB_0$ [13] պինդ սննդամիջավայրերի վրա հարստացված կուլտուրաների ցանքսի արդյունքում աճած դեղին կամ դեղնագորշ գաղութներից: Մանրադիտակային հետազոտության համար բակտերիաները ներկվել են բյուրեղական մա-նուշակագույնով:

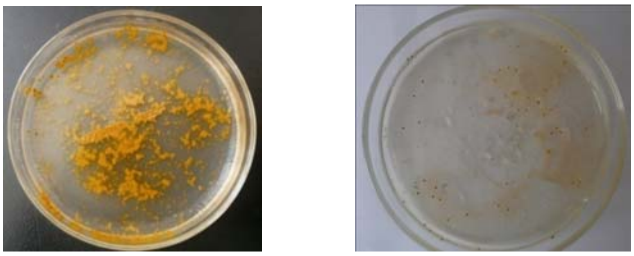
<u>Պիրիտի տարրալվացումը</u>: Պիրիտի տարրալվացման նպատակով օգտագործվել են նոր մե-կուսացված *Leptospirillum* sp. շտ. ZC-ը, ինչպես նաև նախկինում նկարագրված ծծումբ օքսիդացնող *A.albertensis* շտ. SO-2-ը [3]: Բակտերիաներն աճեցվել են որպես էներգիայի աղբյուր Fe^{2+} կամ S^0 պարունակող 9K սննդամիջավայրերում: Աճի լոգարիթմական փուլում բջիջները հավաքվել են ցենտրիֆուգմամբ 6000 g պայմաններում 10 րոպե տևողությամբ: Հավաքված կենսազանգվածը լվացվել է թթվեցրած սննդամիջավայրով և կրկին սուսպենզվել նույն սննդամիջավայրում: Տարրալվացման նպատակով օգտագործվել է Հայաստանի Շամլուղի հանքավայրի պիրիտը՝ FeS_2 (43-63 մկմ): Պիրիտի կշռվածքները տեղավորվել են 250 մլ կոլբաների մեջ, թրջվել թորած ջրով և մանրէազերծվել: Այնուհետև կոլբաների պարունակությանը ավելացվել է 50 մլ 9K սննդամիջավայր, (pH 2,0) և բակտերիաների սուսպենզիա:

Պուլպի խտությունը (Պ:Հ) հաշվարկվել է որպես պիրիտի զանգվածի հարաբերություն սննդամիջավայրի ծավալին: Տարրալվացման փորձերն կատարվել են պարբերական ռեժիմի և թա-փահարման պայմաններում (180 պտ/րոպե) 37^{0}C -ում: Պիրիտի օքսիդացման ինտենսիվությունը գնահատվել է ըստ միջավայր անցած Fe^{3+}, Fe^{2+} իոնների քանակության:

<u>Բակտերիաների ադհեզիան</u>: Բակտերիաների ադհեզիան պիրիտի մակերեսին ուսումնասիրվել է հիմնականում առաջին երկու, որոշ դեպքերում՝ 24 ժ ընթացքում: Կենսունակ բջիջների քանակությունը որոշվել է սահմանային տասնապատիկ նոսրացումների մեթոդով, բջիջների առավել հավանական թիվը՝ ըստ Մակ-Կրեդիի աղյուսակի [4]: Ադհեզված բջիջների քանակությունը որոշվել է որպես ներմուծված բակտերիաների սկզբնական տիտրի և որոշակի ժամանակահատված անց հեղուկ փուլում դիտված բջիջների քանակության տարբերություն: Ադհեզիայի աստիճանը որոշվել է՝ որպես բջիջների սկզբնական տիտրի նկատմամբ ամրացած բջիջների թվի տոկոսային հարաբերություն:

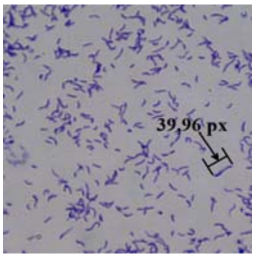
<u>Մետաղների իոնների քանակական անալիզը</u>: Fe^{2+} և Fe^{3+} իոնները որոշվել են կոմպլեքսոմետրիկ տիտրմամբ տրիլոն Trilon Б-ով, ընդհանուր երկաթը՝ AAS 1N ատոմաբսորբցիոն սպեկտրոֆոտոմետրով՝ օդ–պրոպան–բութան բոցի կիրառմամբ:

Արդյունքներ և քննարկում: <u>*Leptospirillum* spp. բակտերիաների մեկուսացումը</u>: Ցինկի խտահումքի տարրալվացման պուլպերից մեկուսացվել է *Leptospirillum* spp. բակտերիաների օրիգինալ շտամ՝ շտ. ZC-ը (նկ.1): Բջիջներն իրենցից ներկայացնում են վիբրիոններ՝ 0,12-0,13 x 0,6-1,0 մկմ չափերով (նկ. 2):

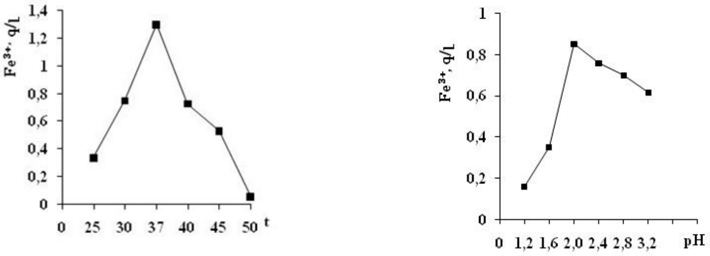


ա բ

Նկ.1. Մեկուսացված *Leptospirillum* sp. շտ. ZC-ի գաղութները (ա) $FeTSB_0$ և (բ) Մաննինգի սննդամիջավայրերի վրա



Նկ.2. Բյուրեղական մանուշակագույնով ներկված *Leptospirillum* sp. շտ. ZC-ի միկրոլուսանկարը (1 պիկսել (px) = 263,6 միկրոմետր)

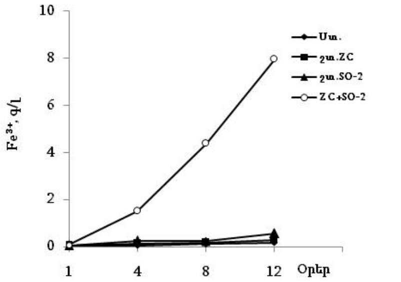


Նկ.3. Fe^{2+}-ի օքսիդացումը մեկուսացված *Leptospirillum* sp. շտ. ZC-ի միջոցով տարբեր ջերմաստիճանների (ա) և pH-ի (բ) պայմաններում (տևողությունը՝ 3 օր)

Մեկուսացված *Leptospirillum* sp. շտ. ZC-ի աճը երկարժեք երկաթ պարունակող սննդամիջավայրում դիտվել է 30-40 ^{0}C ջերմաստիճանային միջակայքում, օպտիմալ ջերմաստիճանը կազմել է 37^{0}C (նկ. 3 ա): pH-ի ազդեցությունը բակտերիայի աճի և երկարժեք երկաթի օքսիդացման ակտիվության վրա ուսումնասիրվել է կուլտիվացման առաջին օրերի ընթացքում, քանի դեռ միջավայրի pH-ի էական փոփոխություն տեղի չի ունեցել: pH-ի օպտիմալ արժեքը կազմել է 2,0, աճի ներքին սահմանը՝ 1,4 (նկ. 3 բ):

<u>*Leptospirillum* sp. շտ. ZC-ի ադհեզիան պիրիտի վրա և պիրիտի տարրալվացումը</u>: Ուսումնասիրվել է պիրիտի տարրալվացումը ցինկի խտահումքից մեկուսացված երկաթ օքսիդացնող *Leptospirillum* sp. շտ. ZC-ի մաքուր և ծծումբ օքսիդացնող *A.albertensis* շտ. SO-2-ի հետ խառը կուլտուրայի միջոցով: Պարզվել է, որ *Leptospirillum* sp. շտ. ZC-ի մաքուր կուլտուրայի ակտիվությունը պիրիտի օքսիդացման գործընթացում չի տարբերվում չինոկուլացված ստուգիչից, իսկ *A.albertensis* շտ. SO-2-ի մաքուր կուլտուրան ցուցաբերում է պիրիտի տարրալվացման շատ ցածր ակտիվու- թյուն: Սակայն *Leptospirillum* sp. շտ. ZC-ի *A.albertensis* շտ. SO-2-ի հետ համատեղ աճեց ման դեպքում խառը կուլտուրայի

ակտիվությունը 40-50 և 15-20 անգամ գերազանցել է համապատասխանաբար ստուգիչի կամ *Leptospirillum* sp. շտ. ZC-ի և *A.albertensis* շտ. SO-2-ի մաքուր կուլտուրաների ակտիվությունը (նկ. 4):



Նկ.4. Պիրիտի (FeS_2) տարրալվացումը *Leptospirillum* sp. շտ. ZC-ի և *A.albertensis* շտ. SO-2-ի և նրանց խառը կուլտուրայի միջոցով

Ստացված արդյունքները թույլ են տալիս եզրակացնել, որ *Leptospirillum* sp. շտ. ZC-ը ցուցաբերում է պիրիտի օքսիդացման բարձր ակտիվություն միայն ծծումբ օքսիդացնող բակտերիաների հետ համատեղ աճեցնելիս:

Հետազոտությունները ցույց են տվել, որ ինչպես մաքուր, այնպես էլ խառը կուլտուրաների դեպքում ինոկուլյացիայից 30 րոպե հետո *A.albertensis* շտ. SO-2-ի ադհեզիան պիրիտի մակերեսին հասնում է առավելագույն՝ 99,99 % -ի (աղ. 1, 2):

Աղ.1. *A.albertensis* շտ. SO-2-ի մաքուր կուլտուրայի ադհեզիան պիրիտի վրա

Ժամանակա-հատվածը	*A. albertensis*-ի բջիջների թիվը հեղուկում, բջ/մլ	Ադհեզված *A.albertensis*-ի բջիջների թիվը, բջ/մլ	Ադհեզիայի աստիճանը, %
0	7,5 x 10^8	0	0
30 րոպե	5,0 x 10^5	7,49 x 10^8	99,93
1 ժ	1.2 x 10^5	7,499 x 10^8	99,98

Leptospirillum sp. շտ. ZC-ի ադհեզիան պիրիտի մակերեսին խառը կուլտուրայի դեպքում հասել է 90,1 %-ի ինոկուլյացիայից 24 ժ հետո միայն, իսկ մաքուր կուլտուրայի դեպքում բջիջների ադհեզիա չի դիտվել (աղ. 2):

Աղ.2. *Leptospirillum* sp. շտ. ZC-ի և *A.albertensis*-ի շտ. SO-2-ի ադհեզիան պիրիտի վրա համատեղ աճի պայմաններում

Ժամանակա-հատվածը	*A.albertensis* շտ. SO-2-ի բջիջների թիվը հեղուկում, բջ/մլ	Ադհեզիայի աստիճանը, %	*Leptospirillum* sp.շտ. ZC- բջիջների թիվը հեղուկում, բջ/մլ	Ադհեզիայի աստիճանը, %
0	7,5 x 10^8	0	1,32 x 10^6	0
30 րոպե	1,2 x 10^7	98,4	1,2 x 10^6	9,1
1 ժ	5,0 x 10^4	99,99	1,0 x 10^5	24,2
24 ժ	-	-	1,2 x 10^5	90,1

Այսպիսով, ստացված տվյալները ցույց են տալիս, որ պիրիտի կենսատարրալվացումն ուղակիորեն կապված է ապարի մակերեսին *Leptospirillum* sp. շտ. ZC-ի ադհեզվելու ունակության հետ: Հետազոտության արդյունքները վկայում են նաև, որ խառը կուլտուրայի դեպքում պիրիտը նախապես գաղութացվում է ծծումբ օքսիդացնող *A.albertensis* շտ. SO-2-ի կողմից, որից հետո միայն դիտվում է *Leptospirillum* sp. շտ. ZC-ի բջիջների ադհեզիան պիրիտի մակերեսին: Հայտնի է, որ ծծումբ օքսիդացնող բակտերիաներն ավելի հակված են ադհեզվելու հիդրոֆոբ մակերեսներին: Քանի որ պիրիտի նախնական մշակման ընթացքում նրա մակերեսից հեռացվել է երկաթը, ենթադրվում է, որ պիրիտի մակերեսին մնացել են ծծմբի մասնիկներ, ինչը նրան օժտել է որոշ հիդրո ֆոբությամբ: Այս հանգամանքով է բացատրվում պիրիտի արագ և առաջ-նային գաղութացումը ծծումբ օքսիդացնող բակտերիաներով, ինչպես նաև ադհեզիայի

բացակայությունը *Leptospirillum* sp. շտ. ZC-ի մոտ, քանի որ վերջիններիս ադհեզիան ապարի մակերեսին տեղի է ունենում հիմնականում էլեկտրաստատիկ ձգողականության շնորհիվ [20]:

Բազմիցս արձանագրվել է, որ ծծումբ օքսիդացնող բակտերիաների բացակայության պայմաններում ծծումբը, կուտակվելով ապարի մակերեսին, կարող է առաջացնել հոծ շերտ, որը բացասաբար է ազդում նրա տարրալվացման կինետիկայի վրա [8, 11]: Այս տեսակետից *A.albertensis* շտ. SO-2-ի ներդրումը պիրիտի ինտենսիվ տարրալուծման գործընթացում կարելի է բացատրել նրանով, որ *A.albertensis*-ը այլ ծծումբ օքսիդացնող բակտերիաների անալոգիայով օքսիդացնում է պիրիտի տարրալուծման միջանկյալ արդյունքը՝ ծծումբը, փոխակերպելով այն ծծմբական թթվի, դրանով իսկ կանխելով կամ նվազեցնելով նրա կուտակումը պիրիտի մակերեսին: Միևնույն ժամանակ հեռացնելով ծծմբի հիդրոֆոբ շերտը պիրիտի մակերեսից, նպաստավոր պայմաններ է ստեղծվում *Leptospirillum* spp. բակտերիաների ադհեզիայի համար: Արդյունքում համատեղ աճեցումը ծծումբ օքսիդացնող *A.albertensis* շտ. SO-2-ի հետ նպաստում է *Leptospirillum* sp. շտ. ZC-ի ադհեզիային պիրիտի մակերեսին և զգալիորեն բարձրացնում է նրա տարրալվացման ինտենսիվությունը:

Այսպիսով, կարելի է եզրակացնել, որ նոր մեկուսացված *Leptospirillum* sp. շտ. ZC-ը ցուցաբերում է պիրիտի օքսիդացման բարձր ակտիվություն միայն ծծումբ օքսիդացնող *A.albertensis* շտ. SO-2-ի հետ համատեղ աճեցնելիս, և որ պիրիտի արդյունավետ կենսատարրալվացման անհրաժեշտ պայման է *Leptospirillum* sp. շտ. ZC-ի ադհեզիան ապարի մակերեսին: Ընդ որում, պարզվել է, որ պիրիտի տարրալուծումը համահարաբերակցական է նրա մակերեսին ադհեզված *Leptospirillum sp.* շտ. ZC-ի բջիջների քանակությանը: Հետևաբար կարելի է ենթադրել, որ *Leptospirillum* spp. բակտերիաների կողմից պիրիտի տարրալվացումը տեղի է ունենում անուղղակի կոնտակտային մեխանիզմով [19, 20]:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. Биогеотехнология металлов /под ред. Г.И.Каравайко, Дж. Росси, А.Агате, С. Грудева, З.А.Авакян. М., Центр Международных проектов ГКНТ, 1989.
2. *Варданян Н.С., Акопян В.П. Leptospirillum* – подобные бактерии и оценка их роли в окислении пирита. Микробиология, *72*, 4, с.1-5, 2003.
3. *Варданян А.К., Хачатрян А.Н., Маркосян Л.С., Варданян Н.С.* Новая сероокисляющая бактерия, выделенная из пульпы биовыщелачивания цинкового концентрата. Биолог. журн. Армении, *65*, 1, 2013.
4. *Герхардт Ф. и др.* Методы общей бактериологии, 3т. М., Мир, *1*, 1983.
5. *Маркосян Г.Е.* Новая железоокисляющая бактерия *Leptospirillum ferrooxidans* nov. gen. nov. sp.. Биолог. журн. Армении, *25*, 2, с.26-29, 1972.
6. *Coram N.J., Rawlings D.E.* Molecular relationship between two groups of the genus *Leptospirillum* and the finding that *Leptospirillum ferriphilum* sp. nov. dominates in South African commercial biooxidation tanks that operate at 40^0C. App. Environ. Microbiology, *68*, 2, p.838-845, 2002.
7. *Dew, D.W., Lawson E.N. and Broadhurst J.L.* The BIOX process for biooxidation of gold-bearing ores or concentrates. Rawlings D.E. (ed.), Biomining: theory, microbes and industrial processes. Springer-Velag/Landes Bioscience, Georgetown,Tex, p.45-80, 1997.
8. *Dopson M., Lindstrom E.B.* Potential role of *Thiobacillus caldus* in arsenopyrite bioleaching. App. Environ. Microbiology, *65*, 1, p.36–40, 1999.
9. *Fub B., Zhoua H., Zhanga R.,* Qiua G. Bioleaching of chalcopyrite by pure and mixed cultures of *Acidithiobacillus* spp. and *Leptospirillum ferriphilum*. Intern. Biodeterioration & Biodegradation *62*, p.109–115, 2008.
10. *Fouchera, S., Bruneta, F.B., D'Huguesa, P., Clarensb, M., Godonc, J.J., Morin, D.* Evolution of the bacterial population during the batch bioleaching of a cobaltiferous pyrite in a suspended solids bubble column and comparison with a mechanically agitated reactor. Hydrometallurgy, *71,* p.5-12, 2003.

11. *Fowler T.A., Crundwell F.K.* Leaching of zinc sulfide by Thiobacillus ferrooxidans: bacterial oxidation of the sulfur product layer increases the rate of zinc sulfide dissolution at high concentrations of ferrous ions. App. Environ. Microbiol., *65,* p.5285-5292, 1999.
12. *Goltsman D.S. A., Denef V.J., Singer S.W., VerBerkmoes N.C., Lefsrud M., Mueller R.S., Dick G.J., Sun Ch.L., Wheeler K.E., Zemla A., Baker B.J., Hauser L., Land M., Shah M.B., Thelen M.P., Hettich R.L., Banfield J.F.* Community Genomic and Proteomic Analyses of Chemoautotrophic Iron-Oxidizing "Leptospirillum rubarum" (Group II) and "*Leptospirillum ferrodiazotrophum*" (Group III) Bacteria in Acid Mine Drainage Biofilms. Appl. Environ. Microbiol., p.4599-4615, 2009.
13. *Johnson B.D., Macvicar J.H.M., Rolfe S.* A new soild medium for the isolation and enumeration of *Thiobacillus ferrooxidans* and acidophilic heterotrophic bacteria. J. Microbiol. Methods, *7*, p.9-18, 1987.
14. *Lawson, E.N.* The composition of mixed populations of leaching bacteria active in gold and nickel recovery from sulphide ores. In: International Biohydrometallurgy Symposium. Biomine 97, Australian Mineral Foundation, Glenside, pp. QP4.1–QP4.10.
15. *Moreno-Paz M., Gomez M.J., Arcas A., Parro V.* Environmental transcriptome analysis reveals physiological differences between biofilm and planktonic modes of life of the iron oxidizing bacteria *Leptospirillum* spp. in their natural microbial community. BMC Genomics, *11*, p.404, 2010.
16. *Okibe N., Gericke M., Hallberg K.B., Johnson D.B.* Enumeration and characterization of acidophilic microorganisms isolated from a pilot plant stirred-tank bioleaching operation. App. Environ. Microbiol., *69*, 4, p. 1936–1943, 2003.
17. *Rawlings D.E., Coram N.J., Gardner M.N., Deane S.M. Thiobacillus caldus* and *Leptospirillum ferrooxians* are widely distributed in continuous-flow biooxidation tanks used to treat a variety of metal-containing ores and concentrates. In: Amils, R., Ballester, A. (Eds.), Biohydrometrallurgy and the Environment Toward the Mining of the 21st Century, Part A. Elsevier Press, Amsterdam, p.773-778, 1999.
18. *Rawlings D.E., Tributsch H., Hansford G.S.* Reasons why '*Leptospirillum*'-like species rather than *T.ferrooxidans* are the dominant iron-oxidizing bacteria in many commercial processes for the biooxidation of pyrite and related ores. Microbiology,*145*, 5-13, 1999.
19. *Rohwerder T., Gehrke T., Kinzler K.,and Sand W.* Bioleaching review part A: progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. Appl. Microbiol. Biotechnol., *63*, p.239–248, 2003.
20. *Sand W, Gehrke T.* Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron (III) ions and acidophilic bacteria. Res Microbiol., *157,* p.49-56, 2006.
21. *Sand W., Rohde K., Sobotke U.* Evolution of *Leptospirillum ferrooxidans* for bioleaching. Appl. Environ. Microbiol., *58,* p.85-92, 1992.
22. *Schippers A.* Microorganisms involved in bioleaching and nucleic acid-based molecular methods for their identification and quantification. In Microbial processing of metal sulfides. Edited by Donati R.E., Sand W. New York, NY, Springer, p.3-33, 2007.

Ստացվել է 02.04.2013

Հայաստանի Գիտությունների Ազգային Ակադեմիա | Հայաստանի Կենսաբանական Հանդես
Национальная Академия Наук Армении | Биологический Журнал Армении
National Academy of Sciences of Armenia | Biological Journal of Armenia

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

Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 3(65), 2013

ՈՐՈՏԱՆ ԳԵՏԻ ԵՎ ՆՐԱ ՀԻՄՆԱԿԱՆ ՎՏԱԿՆԵՐԻ ՋՐԵՐԻ ՀԻԴՐՈ-ՔԻՄԻԱԿԱՆ ԲՆՈՒԹԱԳԻՐԸ ԵՎ ՈՌՈԳԵԼԻ ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

Շ.Վ. ՇԱԼՈՒՆՑ, Կ.Ա. ՂԱԶԱՐՅԱՆ, Կ.Վ. ԳՐԻԳՈՐՅԱՆ

Երևանի պետական համալսարան, էկոլոգիայի և բնության պահպանության ամբիոն,
coolaleq@yandex.ru, *kghazaryan@ysu.am*, *g.karlen@mail.ru*

Ներկայացված է Որոտան, Սիսիան և Գորիսգետ գետերի հիդրոքիմիական բնութագիրը և ոռոգերի հատկությունները: Հաշվարկվել է 2009-2012 թթ. Ժամանակահատվածում ջրերի ընդհանուր հանքայնացումը և իռիգացիոն գործակիցը: Պարզվել է, որ Որոտան, Սիսիան և Գորիսգետ գետերի ջրերը բնութագրվում են լավ ոռոգելի հատկություններով և կարելի է օգտագործել ոռոգման նպատակով՝ առանց հիմքերի կուտակումը կանխարգելող հատուկ միջոցառումների կիրառման:

Ոռոգելի ջուր – հիդրոքիմիական բնութագիր – ոռոգելի հատկություններ – իռիգացիոն գործակից – հողերի աղակալում – ջրի pH

Представлена гидрохимическая характеристика и ирригационные свойства вод рек Воротан, Сисиан и Горисгет. Рассчитаны общая минерализация и ирригационный коэффициент вод в 2009-2012 г. Установлено, что воды рек Воротан, Сисиан и Горисгет характеризуются хорошими ирригационными свойствами и их можно успешно использовать для орошения без специальных мер по предупреждению накопления щелочей.

Оросительная вода – гидрохимическая характеристика – орошаемые свойства – коэффициент ирригации – засоление почв – pH воды

This paper presents hydrochemical characteristics and irrigation properties of rivers Vorotan, Sisian and Gorisget. Total mineralization and irrigation coefficient of water was calculated in 2009-2012. It was established that the waters of rivers Vorotan, Sisian and Gorisget have good irrigation properties and can be successfully used for irrigation without special measures to prevent the -accumulation of alkalis.

Irrigation water – hydrochemical characteristics – irrigated properties – irrigation coefficient – salinization of soil - water pH

Որոտան գետը Սյունիքի մարզի ամենախոշոր գետն է: Այն Արաքսի ձախակողմյան վտակներից է և իր երկարությամբ երկրորդն է երկրում: Հայաստանի Հանրապետության սահմաններում նրա երկարությունը կազմում է 119 կմ, ջրահավաք ավազանը՝ 2170 կմ^2, իսկ ջրահավաք ավազանի միջին բարձրությունը 2280 մետր: Որոտանը սկիզբ է առնում Սյունիքի հրաբխային բարձրավանդակի հյուսիս-արևմտյան լանջերից՝ 3045 մ բարձրության վրա գտնվող երկու փոքրիկ լճերից: Որոտանն ունի զարգացած գետային ցանց, միջին խտությունը կազմում է 1,09 կմ/կմ^2: Նրա ավազանում կան 1133 գետակներ, որոնցից 37-ը ունեն 10 կմ-ից ավել երկարություն: Կարևորագույն վտակներից են Սիսիանը, Գորիսգետը, Այրիգետը, Շաքին և այլն: Որոտանի սնումը ձնանձրևային է (52%), սակայն մեծ դեր ունեն նաև ստորերկրյա ջրերը, որոնց բաժինը գետի հոսքում կազմում է 48 %: Որոտանի ջրային ռեժիմը բնորոշվում է գարնանային հոսքի գերակայությամբ՝ ամառային երբեմնակի վարարումներով: Հորդացումը տևում է ապրիլից մինչև հունիս, իսկ առավելագույնին

Հասնում է մայիսին: Գետի միջին տարեկան ծախսը կազմում է 21,5 մ^3/վ, իսկ տարեկան հոսքի ծավալը՝ 677,3 մլն մ^3: Որոտան գետը ունի մեծ ջրաէներգետիկ և ոռոգիչ նշանակություն: Նրանից սկսվում են Սիսիանի և Որոտանի ջրանցքները, որոնցով ոռոգվում են Սիսիանի և Գորիսի տարածաշրջանների գյուղատնտեսական հողհանդակները [1, 2]:

Ոռոգման նպատակով օգտագործվող ջրերը պետք է համապատասխանեն որոշակի ագրոմելիորատիվ պահանջներին, որպեսզի ապահովեն բարձր բերքատվություն, արտադրանքի բարձր որակ, ինչպես նաև բարձրացվի հողի բերրիությունը և լավացվի մելիորատիվ վիճակը [4, 8]: Ոռոգման համար ջրի պիտանելիությունը կարելի է որոշել ըստ նրա քիմիական կազմի՝ հաշվի առնելով տարածաշրջանի կլիմայական և հողերի ֆիզիկաքիմական առանձնահատկությունները: Ոռոգման արդյունքում չպետք է տեղի ունենա հողերի աղակալում, բույսերի աճի և զարգացման ճնշում, բերքատվության անկում [6]:

Ոռոգման նպատակով օգտագործվող ջրերի որակի բնութագրման համար առաջին հերթին օգտվում են հետևյալ ցուցանիշներից.

- լուծելի աղերի իոնների գումարային պարունակություն (մգ/լ),
- Na^+ պարունակություն (մգ/լ),
- Cl^- պարունակություն (մգ/լ),
- սոդայի առկայություն (Na_2CO_3),
- լուծելի աղերի քիմիական կազմություն (իոնների հարաբերություն):

Այս ցուցանիշների միջոցով կարելի է որոշել ոռոգելի հողերի աղակալման հավանականությունը, ինչպես նաև առանձին տոքսիկ իոնների պարունակությունը, քանի որ աղակալման գործընթացում հողում կուտակված աղերը բույսերի և հողերի վրա թողնում են ոչ միանման ազդեցություն: Նատրիումի աղերը ամենավտանգավորներն են, ընդորում ըստ իրենց բացասական ազդեցության նատրիումի աղերը կարելի է դասակարգել հետևյալ կերպ՝ $Na_2SO_4 : NaCl : Na_2CO_3 = 1 : 3 : 10$: Իսկ աղակալման վտանգի տեսանկյունից սովորաբար ոռոգման համար պիտանի են համարվում այն ջրերը, որոնց հանքայնացումը չի անցնում 1գ/լ-ից: Ընդհանուր առմամբ ծանր և միջին մեխանիկական կազմով հողերի ոռոգման համար օգտագործվող ջրերի սահմանային թույլատրելի հանքայնությունը կազմում է 2-3 գ/լ, իսկ թեթև մեխանիկական կազմ ունեցող հողերի համար՝ 10-12 գ/լ [3]:

Հաշվի առնելով այն, որ ուսումնասիրվող ջրային օբյեկտը Գորիսի և Սիսիանի տարածաշրջանների հողերի ոռոգման համար կարևորագույն աղբյուրն է հանդիսանում, մեր կողմից կատարվել են ջրերի հիդրոքիմիական ուսումնասիրություններ և տրվել է դրանց ոռոգելի հատկությունների բնութագիրը:

Նյութ և մեթոդ: Նմուշները վերցվել են Որոտան գետից և նրա երկու հիմնական վտակներից՝ Սիսիանից և Գորիսգետից, 2009-2012 թթ.՝ յուրաքանչյուր ամիս: Նմուշառումը կատարվել է 8 դիտակետից: Ուսումնասիրությունների ժամանակ օգտագործվել են ջրերի քիմիական վերլուծությունների համար միջազգային պրակտիկայում կիրառվող մեթոդներ [7]:

Աղ.1. Ոռոգելի ջրերի դասակարգումը ըստ հիմքային կամ իռիգացիոն գործակցի

Հիմքային կամ իռիգացիոն գործակից (K)	Ոռոգելի ջրի դասը
Մինչև 1,2	Վատ
1,2 – 5,9	Բավարար
6,0-18	Լավ
18-ից ավել	Գերազանց

Ամենամսյա ուսումնասիրություններից ստացված տվյալներից հաշվարկվել են իոնների միջին սեզոնային պարունակությունը, ինչի հիման վրա էլ տրվել են ջրերի հիդրոքիմիական բնութագիրը և ոռոգելի հատկությունները: Ջրերի ոռոգելի հատկությունների բնութագրման համար օգտագործել ենք հիմքային կամ իռիգացիոն գործակիցը, որը նատրիումի քլորիդների և սուլֆատների պարունակության հարաբերությունն է (աղ.1) [5]:

Արդյունքներ և քննարկում: Սովորաբար ոռոգելի ջրերի որակը գնահատելիս հաշվի են առնում դրանցում ջրալույծ աղերի պարունակությունը: Ըստ այս ցուցանիշի ջրերի որակը կարելի է բնութագրել՝ հիմնվելով աղ. 2-ի վրա:Ըստ հանքայնացման աստիճանի՝ Որոտան և Սիսիան գետերի ջրերը պատկանում են լավ ոռոգելի հատկություններով օժտված ջրերին, քանի որ դրանց հանքայնացման աստիճանը

չի գերազանցում 400 մգ/լ և տատանվում է 30,45-392,92 մգ/լ սահմաններում (աղ. 3, 4, 5, 6):

Աղ.2. Ոռոգելի ջրերի որակի գնահատումը ըստ ջրալույծ աղերի ընդհանուր պարունակության

Մինչև 400 մգ/լ	Օժտված է լավ ոռոգելի հատկություններով
400 – 1000 մգ/լ	Անհրաժեշտ է կատարել լրացուցիչ նախազգուշական միջոցառումներ
1000 – 3000 մգ/լ	Ոռոգման նպատակով օգտագործման դեպքում հնարավոր է հողերի աղակալում
3000 մգ/լ-ից ավելի	Համարվում են վատ որակի, քանի որ դրանց կիրառման դեպքում հողերի աղակալումն անխուսափելի է

Ի դեպ, նվազագույն հանքայնացման աստիճանը հիմնականում նկատվել է Որոտան գետի վերին հոսանքներում (0,5 կմ Գորիայքից վերև գտնվող դիտակետում), իսկ համեմատաբար բարձր հանքայնացման աստիճան նկատվել Սիսիան քաղաքից 2 կմ ներքև գտնվող դիտակետում: Այն մեր կարծիքով անմիջականորեն պայմանավորված է Սիսիան քաղաքի կոմունալ կենցաղային հոսքաջրերով, որոնք առանց որևէ մաքրման լցվում են Որոտան գետ: Իսկ Գորիսգետի ջրերի հանքայնացման աստիճանը տատանվել է 78,12-458,31 մգ/լ միջակայքում և ըստ աղ. 2-ում բերված գնահատման սանդղակի երբեմն (օր.՝ 2012 թ., ամառ) անհրաժեշտ է կատարել լրացուցիչ նախազգուշական միջոցառումներ: Սակայն, քանի որ հանքայնացման աստիճանի գերազանցումը 400 մգ/լ նիշից աննշան է, և այն նկատվում է ոչ բոլոր տարիներին, անհրաժեշտություն չկա կիրառել աղակալման գործընթացը կանխարգելող միջոցառումներ: Հարկ է նշել, որ հանքայնացման աստիճանի բարձրացումը այս դեպքում ևս պայմանավորված է քաղաքային համայնքի (Գորիս քաղաք) կոմունալ կենցաղային հոսքաջրերով և այն հիմնականում նկատվում է այն սեզոններին, երբ նվազում է գետի բնական հոսքը և մեծանում է գետի ընդհանուր հոսքում կենցաղային հոսքաջրերի չափաբաժինը: Իսկ Գորիս քաղաքից վերև տարվա բոլոր սեզոններին նկատվել է ջրի հանքայնացման ցածր աստիճան: Սա կարելի է բացատրել մարդածին գործոնի ազդեցության փոքր ծավալներով, որոնք ըստ էության չեն կարող էական փոփոխություններ թողնել գետի ջրերի բնական հանքայնացման աստիճանի վրա:

Աղ.3. 2009 թ. Որոտան, Սիսիան և Գորիսգետ գետերի ջրերի քիմիական բաղադրությունը (մգ/լ) և ոռոգելի հատկությունները

Ջրային օբյեկտ	Դիտակետի տեղադրությունը	Ժամանակահատված	Ջրածնային ցուցիչ	Na^+	Mg^{2+}	K^+	Ca^{2+}	HCO_3^-	SO_4^{2-}	Cl^-	Իոնների գումարը, մգ/լ	K
Որոտան	0,5 կմ Գորիայքից վերև	միջին ձմեռ	7,22	6,1	1,46	2,04	6,3	33,56	3,88	1,48	54,82	168
	0,5 կմ Գորիայքից վերև	միջին գարուն	7,9	2,29	1,52	13,87	4,57	44,75	3,3	0,7	71	1035
	0,5 կմ Գորիայքից վերև	միջին ամառ	7,28	3,06	1,33	1,62	4,94	44,75	2,84	1,1	59,64	448
	0,5 կմ Գորիայքից վերև	միջին աշուն	8,16	3,29	1,78	1,86	5,54	44,75	3,51	1,47	62,2	509
	1 կմ բ, Սիսիանից վերև	միջին ձմեռ	7,77	7,59	4,61	2,27	13,52	67,12	24,75	2,83	122,69	444
	1 կմ բ, Սիսիանից վերև	միջին գարուն	8,56	11,31	4,78	8,24	17,11	88,48	30,2	3,68	163,8	318
	1 կմ բ, Սիսիանից վերև	միջին ամառ	8,25	10,98	3,81	3,16	14,91	90,51	29,04	3,14	155,55	346
	1 կմ բ, Սիսիանից վերև	միջին աշուն	8,01	6,9	4,5	3,04	13,88	69,16	21,87	2,8	122,15	468
	2 կմ բ, Սիսիանից ներքև	միջին ձմեռ	7,4	32,42	13,82	5,29	27,34	216,62	78,33	19,1	392,92	81
	2 կմ բ, Սիսիանից ներքև	միջին գարուն	8,22	15,51	7,39	9,63	27,4	110,85	49,16	6,53	226,47	204
	2 կմ բ, Սիսիանից ներքև	միջին ամառ	7,79	19,1	8,13	4,46	25,64	146,45	51	7,61	262,39	171
	2 կմ բ, Սիսիանից ներքև	միջին աշուն	7,99	15,55	8,28	4,21	22,72	114,92	46,26	6,82	218,76	199
	1 կմ բ, Սիսիանից վերև	միջին ձմեռ	8,05	10,73	5,7	2,95	27,57	110,85	27,87	5,92	191,59	254
	1 կմ բ, Սիսիանից վերև	միջին գարուն	7,87	9,95	5,87	7,8	27,32	167,81	29,14	5,76	253,65	266
	1 կմ բ, Սիսիանից վերև	միջին ամառ	7,95	11,65	8,56	3,44	30,34	152,55	60,33	5,54	272,41	255

	1 կմ ք, Սիսիանից վերև	միջին աշուն	8,26	10,65	7,63	1,45	47,44	132,72	91,24	4,61	295,74	293
	2 կմ ք, Սիսիանից ներքև	միջին ձմեռ	8,15	1,68	1,94	13,7	13,43	68,65	10,95	0,71	111,06	1882
	2 կմ ք, Սիսիանից ներքև	միջին գարուն	6,66	6,73	5,37	1	37,38	137,3	48,33	2,18	238,29	535
	2 կմ ք, Սիսիանից ներքև	միջին ամառ	7,83	8,64	10,53	1,2	52,15	187,64	100,58	4,94	365,68	309
	2 կմ ք, Սիսիանից ներքև	միջին աշուն	8,17	8,36	4,23	2,44	18,26	64,07	12,34	2,1	111,8	281
	0,5 կմ Տաթև ՀԷԿ-ից ներքև	միջին ձմեռ	8,44	3,96	2,8	14,15	16,52	79,33	12,91	1,59	131,26	820
	0,5 կմ Տաթև ՀԷԿ-ից ներքև	միջին գարուն	7,81	5,25	3,52	1,8	18,65	102,72	13,04	1,85	146,83	659
	0,5 կմ Տաթև ՀԷԿ-ից ներքև	միջին ամառ	8,04	3,73	3,29	1,78	14,23	84,41	14,85	2,86	125,15	595
	0,5 կմ Տաթև ՀԷԿ-ից ներքև	միջին աշուն	7,58	5,26	4,23	1,82	14,27	71,19	4,48	1,92	103,17	245
Սիսիան	0,5 կմ գյ, Արևիսից վերև	միջին ձմեռ	7,71	4,43	3,43	10,6	13,82	88,48	3,47	1,47	125,7	270
	0,5 կմ գյ, Արևիսից վերև	միջին գարուն	7,18	6,07	4,03	1,63	15,87	95,6	4,37	1,8	129,37	184
	0,5 կմ գյ, Արևիսից վերև	միջին ամառ	7,98	4,9	5,35	2,92	26,71	87,46	4,44	2,35	134,13	298
	0,5 կմ գյ, Արևիսից վերև	միջին աշուն	8,25	12,48	6,68	5,05	48,24	288,83	14,9	8,2	384,38	195
	Գետաբերան	միջին ձմեռ	8,23	11,36	7,13	13,8	45,63	240,01	12,35	7,52	337,8	184
	Գետաբերան	միջին գարուն	7,55	19,93	10,64	7,5	59,19	334,59	16,14	10,32	458,31	69
	Գետաբերան	միջին ամառ	7,93	10,81	8,71	5,54	47,97	296,96	21,71	11,52	403,22	163
	Գետաբերան	միջին աշուն	7,22	6,1	1,46	2,04	6,3	33,56	3,88	1,48	54,82	168
Գորիսգետ	3 կմ ք, Գորիսից վերև	միջին ձմեռ	7,9	2,29	1,52	13,87	4,57	44,75	3,3	0,7	71	1035
	3 կմ ք, Գորիսից վերև	միջին գարուն	7,28	3,06	1,33	1,62	4,94	44,75	2,84	1,1	59,64	448
	3 կմ ք, Գորիսից վերև	միջին ամառ	8,16	3,29	1,78	1,86	5,54	44,75	3,51	1,47	62,2	509
	3 կմ ք, Գորիսից վերև	միջին աշուն	7,77	7,59	4,61	2,27	13,52	67,12	24,75	2,83	122,69	444
	1,5 կմ ք, Գորիսից ներքև	միջին ձմեռ	8,56	11,31	4,78	8,24	17,11	88,48	30,2	3,68	163,8	318
	1,5 կմ ք, Գորիսից ներքև	միջին գարուն	8,25	10,98	3,81	3,16	14,91	90,51	29,04	3,14	155,55	346
	1,5 կմ ք, Գորիսից ներքև	միջին ամառ	8,01	6,9	4,5	3,04	13,88	69,16	21,87	2,8	122,15	468
	1,5 կմ ք, Գորիսից ներքև	միջին աշուն	7,4	32,42	13,82	5,29	27,34	216,62	78,33	19,1	392,92	81

Աղ.4. 2010 թ. Որոտան, Սիսիան և Գորիսգետ գետերի ջրերի քիմիական բաղադրությունը (մգ/լ) և ոռոգելի հատկությունները

Ջրային օբյեկտ	Դիտակետի տեղադրությունը	Ժամանակա-հատված	Ջրածնային ցուցիչ	Na^{+}	Mg^{2+}	K^{+}	Ca^{2+}	HCO_3^{-}	SO_4^{2-}	Cl^{-}	Իոնների գու-մարը, մգ/լ	K
Որոտան	0,5 կմ Գորհայքից վերև	միջին ձմեռ		3.23	2.63	2.24	7.76	54.92	5.88	1.25	77.91	1024
	0,5 կմ Գորհայքից վերև	միջին գարուն	7.89	2.41	1.74	1.41	5.37	24.41	3.26	0.9	39.5	930
	0,5 կմ Գորհայքից վերև	միջին ամառ	7.26	3.05	1.76	1.48	5.58	26.44	2.23	1.13	41.67	385
	0,5 կմ Գորհայքից վերև	միջին աշուն	7.48	3.39	2.41	2.19	7.28	27.46	2.87	0.99	46.59	362
	1 կմ ք, Սիսիանից վերև	միջին ձմեռ	8.16	10.65	6.29	3.94	19.08	64.07	30.55	3.73	138.31	326
	1 կմ ք, Սիսիանից վերև	միջին գարուն	8.62	9.32	5.04	2.66	16.19	65.09	30.39	3.6	132.29	355
	1 կմ ք, Սիսիանից վերև	միջին ամառ	7.4	7.4	4.24	2.87	14.45	55.94	23.57	3.01	111.48	436
	1 կմ ք, Սիսիանից վերև	միջին աշուն	8.02	12.31	5.66	4.11	18.44	77.8	28.35	3.27	149.94	319

Սիսիան	2 կմ ք, Սիսիանից ներքև	միջին ձմեռ	7.98	17.3	10.19	5.17	28.41	100.68	45.62	9.3	216.67	160
	2 կմ ք, Սիսիանից ներքև	միջին գարուն	8.09	15.37	7.87	3.3	23.77	103.73	45.17	8.2	207.41	181
	2 կմ ք, Սիսիանից ներքև	միջին ամառ	7.1	17.88	8.1	3.66	24.26	85.43	45.68	8.54	193.55	166
	2 կմ ք, Սիսիանից ներքև	միջին աշուն	7.87	22.62	10.76	5.76	31.81	109.84	48.73	9.31	238.83	142
	0,5 կմ Տաթև ՀԷԿ-ից ներքև	միջին ձմեռ	8.16	11.97	9.15	3.67	34.19	111.36	26.83	6.09	203.26	239
	0,5 կմ Տաթև ՀԷԿ-ից ներքև	միջին գարուն	8.2	8.82	6.17	1.98	25.88	101.7	26.49	5.07	176.11	302
	0,5 կմ Տաթև ՀԷԿ-ից ներքև	միջին ամառ	6.61	12.67	7.26	2.45	31.13	79.33	29.46	6.3	168.6	228
	0,5 կմ Տաթև ՀԷԿ-ից ներքև	միջին աշուն	7.66	16.51	10.37	4.1	40.72	127.13	26.8	6.19	231.82	203
	0,5 կմ գյ, Արևիսից վերև	միջին ձմեռ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,5 կմ գյ, Արևիսից վերև	միջին գարուն	7.87	2.36	2.77	0.46	13.76	38.14	12.77	1.22	71.48	1200
	0,5 կմ գյ, Արևիսից վերև	միջին ամառ	7.31	7.36	6.46	0.73	36.4	65.6	54.36	2.26	173.17	501
	0,5 կմ գյ, Արևիսից վերև	միջին աշուն	7.67	11.83	12.86	1.57	63.63	64.07	99.22	3.78	256.96	306
	Գետաբերան	միջին ձմեռ	8.14	4.99	4.78	2.58	18.16	61.02	15.68	1.97	109.18	656
	Գետաբերան	միջին գարուն	8.46	4.46	3.87	1.44	17.07	69.16	16.21	2.13	114.34	664
	Գետաբերան	միջին ամառ	7.74	4.35	3.3	1.59	16.36	49.83	11.6	1.86	88.89	722
	Գետաբերան	միջին աշուն	8.58	3.57	4.16	2.02	16.51	61.02	22.62	4.74	114.64	418
Գորիսգետ	1,5 կմ ք, Գորիսից վերև	միջին ձմեռ	7.77	5.24	4.69	2.32	15.34	61.02	4.51	1.4	94.52	233
	1,5 կմ ք, Գորիսից վերև	միջին գարուն	7.88	4.47	3.28	1.26	11.49	57.97	3.64	1.72	83.83	283
	1,5 կմ ք, Գորիսից վերև	միջին ամառ	7.39	5.15	4.48	1.59	17.24	56.95	5.77	1.92	93.1	325
	1,5 կմ ք, Գորիսից վերև	միջին աշուն	7.26	4.61	5.38	2.55	18.32	68.65	5.37	2.9	107.78	489
	1,5 կմ ք, Գորիսից ներքև	միջին ձմեռ	8.26	15.31	13.18	7.43	66.03	196.79	14.85	10.97	324.56	124
	1,5 կմ ք, Գորիսից ներքև	միջին գարուն	8.33	10.72	7.56	4.19	39.97	191.2	14.48	8.71	276.83	199
	1,5 կմ ք, Գորիսից ներքև	միջին ամառ	7	18.63	12.16	7	74.5	237.98	21.81	12.13	384.21	125
	1,5 կմ ք, Գորիսից ներքև	միջին աշուն	8.35	18.23	13.25	7.62	67.44	239.5	17.82	12.17	376.03	100

Աղ.5. 2011 թ. Որոտան, Սիսիան և Գորիսգետ գետերի ջրերի քիմիական բաղադրությունը (մգ/լ) և ոռոգելի հատկությունները

Ջրային օբյեկտ	Դիտակետի տեղադրությունը	Ժամանակահատված	Ջրածնային ցուցիչ	Na^{+}	Mg^{2+}	K^{+}	Ca^{2+}	HCO_3^{-}	SO_4^{2-}	Cl^{-}	Իոնների գումարը, մգ/լ	K
	0,5 կմ Գորհայքից վերև	միջին ձմեռ	7.69	2.66	1.73	1.62	4.89	15.26	3.39	0.91	30.45	735
	0,5 կմ Գորհայքից վերև	միջին գարուն	7.68	2.82	1.84	1.52	5.85	22.88	3.95	0.99	39.86	840
	0,5 կմ Գորհայքից վերև	միջին ամառ	8.17	2.80	1.89	1.45	5.49	17.29	2.50	0.63	32.05	437
	0,5 կմ Գորհայքից վերև	միջին աշուն	7.17	3.34	2.13	1.49	5.17	42.71	3.32	0.83	59.00	404
	1 կմ ք, Սիսիանից վերև	միջին ձմեռ	7.54	9.50	4.48	2.86	14.84	30.51	26.30	2.86	91.34	392
	1 կմ ք, Սիսիանից վերև	միջին գարուն	7.88	9.95	4.83	2.70	15.97	50.85	22.28	2.77	109.35	387

	1 կմ ք, Սիսիանից վերև	միջին ամառ	8.13	10.67	5.06	3.41	15.75	49.83	30.60	3.22	118.54	348
	1 կմ ք, Սիսիանից վերև	միջին աշուն	8.05	9.41	5.68	2.65	14.41	88.48	26.45	3.08	150.15	381
	2 կմ ք, Սիսիանից ներքև	միջին ձմեռ	7.40	15.00	7.14	3.71	22.51	48.82	42.85	7.50	147.53	192
	2 կմ ք, Սիսիանից ներքև	միջին գարուն	7.56	12.09	6.32	3.43	24.59	77.29	33.24	5.84	162.79	243
	2 կմ ք, Սիսիանից ներքև	միջին ամառ	7.87	17.66	7.62	4.72	27.08	88.48	53.14	9.65	208.35	155
	2 կմ ք, Սիսիանից ներքև	միջին աշուն	8.03	18.24	8.81	3.82	25.71	108.31	49.67	9.63	224.19	153
	0,5 կմ Տաթև ՀԷԿ-ից ներքև	միջին ձմեռ	8.08	16.51	8.77	3.92	32.15	66.11	30.02	8.25	165.72	175
	0,5 կմ Տաթև ՀԷԿ-ից ներքև	միջին գարուն	7.91	11.76	7.36	2.53	36.15	98.65	27.39	5.54	189.37	254
	0,5 կմ Տաթև ՀԷԿ-ից ներքև	միջին ամառ	8.00	11.44	7.12	2.77	28.48	89.50	28.23	6.08	173.61	244
	0,5 կմ Տաթև ՀԷԿ-ից ներքև	միջին աշուն	7.97	11.70	7.33	2.90	27.32	123.06	31.57	6.96	210.83	223
	0,5 կմ գյ, Արևիսից վերև	միջին ձմեռ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,5 կմ գյ, Արևիսից վերև	միջին գարուն	7.80	3.12	2.71	0.86	15.64	39.66	13.62	1.18	76.81	1072
	0,5 կմ գյ, Արևիսից վերև	միջին ամառ	8.03	5.78	4.83	0.96	31.04	71.19	46.44	2.14	162.38	585
	0,5 կմ գյ, Արևիսից վերև	միջին աշուն	8.30	10.21	8.43	0.74	49.81	67.12	100.58	4.18	241.07	315
	Գետաբերան	միջին ձմեռ	7.65	6.57	3.68	1.88	15.44	18.31	12.17	1.68	59.72	607
	Գետաբերան	միջին գարուն	7.84	5.83	4.51	1.73	21.93	65.60	19.04	1.93	120.57	611
	Գետաբերան	միջին ամառ	8.13	3.96	3.42	1.64	15.14	46.78	10.11	1.75	82.80	780
	Գետաբերան	միջին աշուն	8.40	4.44	3.85	1.36	14.21	76.28	11.31	1.65	113.08	761
	3 կմ ք, Գորիսից վերև	միջին ձմեռ	7.30	5.71	4.51	2.02	16.91	36.61	5.61	2.26	73.64	259
	3 կմ ք, Գորիսից վերև	միջին գարուն	7.88	5.87	3.86	1.56	15.37	54.92	3.98	1.54	87.09	181
	3 կմ ք, Գորիսից վերև	միջին ամառ	7.97	4.89	4.36	1.64	15.04	51.87	4.26	1.59	83.65	261
	3 կմ ք, Գորիսից վերև	միջին աշուն	7.89	5.62	4.87	1.92	15.21	75.26	4.33	1.89	109.10	211
	1,5 կմ ք, Գորիսից ներքև	միջին ձմեռ	8.42	21.91	13.11	8.40	69.03	169.33	19.04	13.20	314.03	70
	1,5 կմ ք, Գորիսից ներքև	միջին գարուն	7.77	13.83	8.16	5.09	55.24	180.01	14.91	8.86	286.09	146
	1,5 կմ ք, Գորիսից ներքև	միջին ամառ	7.93	16.65	9.66	7.57	59.49	207.47	18.02	11.42	330.27	128
	1,5 կմ ք, Գորիսից ներքև	միջին աշուն	8.31	17.06	10.83	6.19	67.17	288.83	17.57	13.64	421.28	126

Աղ.6. 2012 թ. Որոտան, Սիսիան և Գորիսգետ գետերի ջրերի քիմիական բաղադրությունը (մգ/լ) և ոռոգելի հատկությունները

Ջրային օբյեկտ	Դիտակետի տեղադրությունը	Ժամանակա-հատված	Ջրածնային ցուցիչ	Na^{+}	Mg^{2+}	K^{+}	Ca^{2+}	HCO_3^{-}	SO_4^{2-}	Cl^{-}	Իոնների գու-մարը, մգ/լ	K
Որոտան	0,5 կմ Գորհայքից վերև	միջին ձմեռ	7,22	6,1	1,46	2,04	6,3	33,56	3,88	1,48	54,82	168
	0,5 կմ Գորհայքից վերև	միջին գարուն	7,9	2,29	1,52	13,87	4,57	44,75	3,3	0,7	71	1035
	0,5 կմ Գորհայքից վերև	միջին ամառ	7,28	3,06	1,33	1,62	4,94	44,75	2,84	1,1	59,64	448

	0,5 կմ Գորհայքից վերև	միջին աշուն	8,16	3,29	1,78	1,86	5,54	44,75	3,51	1,47	62,2	509
	1 կմ ք, Սիսիանից վերև	միջին ձմեռ	7,77	7,59	4,61	2,27	13,52	67,12	24,75	2,83	122,69	444
	1 կմ ք, Սիսիանից վերև	միջին գարուն	8,56	11,31	4,78	8,24	17,11	88,48	30,2	3,68	163,8	318
	1 կմ ք, Սիսիանից վերև	միջին ամառ	8,25	10,98	3,81	3,16	14,91	90,51	29,04	3,14	155,55	346
	1 կմ ք, Սիսիանից վերև	միջին աշուն	8,01	6,9	4,5	3,04	13,88	69,16	21,87	2,8	122,15	468
	2 կմ ք, Սիսիանից ներքև	միջին ձմեռ	7.4	32.42	13.82	5.29	27.34	216.62	78.33	19.1	392.92	81
	2 կմ ք, Սիսիանից ներքև	միջին գարուն	8.22	15.51	7.39	9.63	27.4	110.85	49.16	6.53	226.47	204
	2 կմ ք, Սիսիանից ներքև	միջին ամառ	7.79	19.1	8.13	4.46	25.64	146.45	51	7.61	262.39	171
	2 կմ ք, Սիսիանից ներքև	միջին աշուն	7.99	15.55	8.28	4.21	22.72	114.92	46.26	6.82	218.76	199
	0,5 կմ Տաթև ՀԷԿ-ից ներքև	միջին ձմեռ	8,05	10,73	5,7	2,95	27,57	110,85	27,87	5,92	191,59	254
	0,5 կմ Տաթև ՀԷԿ-ից ներքև	միջին գարուն	7,87	9,95	5,87	7,8	27,32	167,81	29,14	5,76	253,65	266
	0,5 կմ Տաթև ՀԷԿ-ից ներքև	միջին ամառ	7.61	15.08	7.24	2.94	33.64	171.87	30.09	5.99	266.85	216
	0,5 կմ Տաթև ՀԷԿ-ից ներքև	միջին աշուն	7.95	11.65	8.56	3.44	30.34	152.55	60.33	5.54	272.41	255
Սիսիան	0,5 կմ գյ, Արևիսից վերև	միջին ձմեռ	8.26	10.65	7.63	1.45	47.44	132.72	91.24	4.61	295.74	293
	0,5 կմ գյ, Արևիսից վերև	միջին գարուն	8.15	1.68	1.94	13.7	13.43	68.65	10.95	0.71	111.06	1882
	0,5 կմ գյ, Արևիսից վերև	միջին ամառ	6.66	6.73	5.37	1	37.38	137.3	48.33	2.18	238.29	535
	0,5 կմ գյ, Արևիսից վերև	միջին աշուն	7.83	8.64	10.53	1.2	52.15	187.64	100.58	4.94	365.68	309
	Գետաբերան	միջին ձմեռ	8.17	8.36	4.23	2.44	18.26	64.07	12.34	2.1	111.8	281
	Գետաբերան	միջին գարուն	8.44	3.96	2.8	14.15	16.52	79.33	12.91	1.59	131.26	820
	Գետաբերան	միջին ամառ	7.81	5.25	3.52	1.8	18.65	102.72	13.04	1.85	146.83	659
	Գետաբերան	միջին աշուն	8.04	3.73	3.29	1.78	14.23	84.41	14.85	2.86	125.15	595
Գորիսգետ	3 կմ ք, Գորիսից վերև	միջին ձմեռ	7.58	5.26	4.23	1.82	14.27	71.19	4.48	1.92	103.17	245
	3 կմ ք, Գորիսից վերև	միջին գարուն	7.71	4.43	3.43	10.6	13.82	88.48	3.47	1.47	125.7	270
	3 կմ ք, Գորիսից վերև	միջին ամառ	7.18	6.07	4.03	1.63	15.87	95.6	4.37	1.8	129.37	184
	3 կմ ք, Գորիսից վերև	միջին աշուն	7.98	4.9	5.35	2.92	26.71	87.46	4.44	2.35	134.13	298
	1,5 կմ ք, Գորիսից ներքև	միջին ձմեռ	8.25	12.48	6.68	5.05	48.24	288.83	14.9	8.2	384.38	195
	1,5 կմ ք, Գորիսից ներքև	միջին գարուն	8.23	11.36	7.13	13.8	45.63	240.01	12.35	7.52	337.8	184
	1,5 կմ ք, Գորիսից ներքև	միջին ամառ	7.55	19.93	10.64	7.5	59.19	334.59	16.14	10.32	458.31	69
	1,5 կմ ք, Գորիսից ներքև	միջին աշուն	7.93	10.81	8.71	5.54	47.97	296.96	21.71	11.52	403.22	163

Հաշվի առնելով այն փաստը, որ ոռոգման ջրի pH-ը ևս կարող է իր ազդեցությունը թողնել հողի որոշ ագրոքիմիական հատկությունների վրա և նվազեցնել բերքատվությունը, մենք ուսումնասիրել ենք նաև Որոտան, Սիսիան և Գորիսգետ գետերի ջրերի pH-ը: Այս ցուցանիշը տատանվել է 6,49-8,62 միջակայքում, որը ըստ միջազգային չափորոշիչների համարվում է լավ և ոռոգման ընթացքում չի կարող բացասական ազդեցություն թողնել հողերի ագրոքիմիական հատկությունների վրա:

Ոռոգիչ ջրերի որակի բնութագրման համար շատ հաճախ օգտագործում են նաև հիմքային կամ իռիգացիոն գործակիցը, որը նատրիումի քլորիդների և սուլֆատների պարունակության հարաբերությունն է: Համաձայն այս սանդղակի, եթե իռիգացիոն գործակիցը մեծ է 18-ից, ապա այդ ջրերը կարելի է օգտագործել ոռոգման նպատակով՝ առանց աղակալման և ալկալիացման դեմ որևէ միջոցառման կիրառման (աղ. 1): Համաձայն մեր ուսումնասիրությունների՝ Որոտան, Սիսիան և Գորիսգետ գետերի ջրերի իռիգացիոն գործակիցը բավականին բարձր է: 2009-2012թթ. ժամանակահատվածում լավագույն արժեքը գրանցվել է 2012 թ.-ին Սիսիան գետի վերին հոսանքում (Արևիս գյուղից 0,5 կմ վերև), որը կազմել է 1882: Հարկ է նշել, որ ուսումնասիրության գրեթե բոլոր տարիներին ջրերի

ամենաբարձր իոնիզացիոն գործակիցները նկատվել են վերը նշված նմուշառման կետում: Իսկ ամենացածր իոնիզացիոն գործակիցները 2009-2012 թթ. նկատվել են Գորիսգետում՝ Գորիս քաղաքից 1,5 կմ ներքև գտնվող դիտակետում, և այն հավասար է եղել 69-ի: Այս ցուցանիշը ևս ըստ միջազգային չափորոշիչների համարվում է շատ բարձր արժեք, և այդ ջրերը առանց որևէ նախնական կանխարգելիչ միջոցառումների կարելի է օգտագործել ոռոգման նպատակով:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. Հայկական ՍՍՀ ջրագրություն. Երևան, ՀՍՍՀ ԳԱ հրատ, 178 էջ, 1981:
2. Հայկական ՍՍՀ ֆիզիկական աշխարհագրություն: ՀՍՍՀ ԳԱ, 471 էջ, 1971:
3. *Вальков В.Ф., Казеев К.Ш., Колесников С.И.* Экология почв: Учебное пособие для студентов вузов. Часть 2. Ростов-на-Дону: УПЛ РГУ, 54 с., 2004.
4. *Маматов С.А.* Современные тенденции изменения качества воды реки Сырдарья. “САНИИРИ – 80 лет. 1925-2005”: Сборник научных трудов. АНИИРИ. Ташкент, с. 251-258, 2006.
5. *Радов А.С., Пустовой И.В., Корольков А.В.* Практикум по агрохимии. Изд. “Колос”. М., 336 с., 1971.
6. *Снипич Ю.Ф.* Техника и технология орошения в современных условиях землепользования. Мелиорация и водное хозяйство, 6, с. 28-30, 2006.
7. Унифицированные методы анализа вод. Изд.-во 2. М., “Химия”, 376 с., 1973.
8. *Shirokova Y., Mamatov S., Dermoyan T.* The problems of pollution watersources in the Republic of Uzbekistan. 2nd International Toxic Algae Control Symposium. Tsukuba, Japan, p. 20-22, 2002.

Ստացվել է 22.04.2013

Հայաստանի Գիտությունների Ազգային Ակադեմիա
Национальная Академия Наук Армении
National Academy of Sciences of Armenia

Հայաստանի Կենսաբանական Հանդես
Биологический Журнал Армении
Biological Journal of Armenia

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

Биолог. журн. Армении, 3 (65), 2013

МОЛОЧНАЯ ПРОДУКТИВНОСТЬ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МОЛОКА МЕСТНЫХ КОЗ АРМЕНИИ

Г.Ю. МАРМАРЯН*, Г.С. МАРКАРЯН **

** Национальный аграрный университет Армении*
*** Козоводческий центр АРИД Вайоцдзорского марза*
gmarmaryan@gmail.com

Изучали молочную продуктивность и физико-химические свойства молока местных коз, разводимых в Армении. Установлено, что товарная молочная продуктивность характеризуется средними величинами и составляет 133,57 литров. Содержание жира в июне составляет 4,87%, в августе – 7,14%, количество сухих веществ соответственно 14,92 и 16,92%, а уровень белка остается практически неизменным (3,73-3,80%). Соотношение жира и белка колеблется в пределах 1,28-1,91.

Коза – молочность – жир – белок – плотность

Ուսումնասիրվել են Հայաստանում բուծվող տեղական այծերի կաթնատվությունը և կաթի ֆիզիկաքիմիական հատկությունները: Պարզաբանվել է, որ ապրանքային կաթնատվությունը բնութագրվում է միջին ցուցանիշներով և կազմել է 133,57 լիտր: Հունիսին ճարպի քանակը 4,87% է, օգոստոսին՝ 7,14%, չոր նյութերի քանակը համապատասխանաբար 14,92% և 16,92%, իսկ սպիտակուցի մակարդակը մնացել է գրեթե անփոփոխ (3,73-3,80%). Ճարպ / սպիտակուց հարաբերությունը տատանվում է 1,28-1,91 սահմաններում:

Այծ – կաթնատվություն – ճարպ – սպիտակուց – խտություն

The milk productivity and physical and chemical composition of the milk of local goats bred in Armenia were studied. The results showed that milk productivity is characterized by average values and comprises 133,57 liter. The fat content in June comprises 4,87 %, in August – 7,14 %, the dry matters – 14, 92% and 16,92% respectively, while the protein level stays almost unchanged (3,73-3,80%). The fat / protein ratio fluctuates between 1,28-1,91.

Goat – milk productivity – fat – protein – density

Козье молоко – уникальный продукт. В нем содержится большое количество аминокислот, которые повышают устойчивость организма к инфекционным заболеваниям и нормализуют холестериновый обмен. Белок, глюкоза и лактоза козьего молока легче усваиваются, так как жировые шарики в нем мельче и равномерно распространены по всей массе. Козье молоко особенно ценный продукт для питания детей и людей с желудочно-кишечными заболеваниями и в отличие от коровьего не содержит аллергенов [10]. Оно отличается повышенными антиинфекционными, антианемическими и антигеморрагическими свойствами.

Козы лучше других домашних животных защищены от облучения. Считается, что их кожа защищает от средних и малых доз радиации. После аварии на Чернобыльской АЭС многочисленные научные работы неоспоримо доказали эти свойства.

Следы вредных элементов не были найдены лишь в козьем молоке и мясе. Поэтому, и в силу других факторов, козье молоко и молочные продукты (сыр, кефир, йогурт) не только являются одним из самых совершенных продуктов питания, известных людям, но и могут служить лечебным целям [11].

По данным ФАО, в 2008 г. в России было произведено 246 тыс. тонн козьего молока, в Испании – 593 тыс.т., Франции – 573 тыс.т., Греции – 505 тыс.т. Численность молочных коз в Европе составляет 6 % от общемирового поголовья, а объем производства козьего молока превышает 17 % [4].

По Шаталову [8], производство козьего молока в мире с 1980 по 2008 возрасло на 96,6 % и составило 15215 тыс. тонн, тогда как общее производство молока возрасло лишь на 38 %.

Рассматривая развитие козоводства в мире, необходимо признать, что Армения в историческом аспекте этой отрасли не уделяла достаточного внимания и развивалась в основном исключительно за счет личных хозяйств населения, а о племенной работе отрасли говорить и не приходится.

Именно это обстоятельство побудило ученых Национального аграрного университета Армении в содействии с департаментом сельского хозяйства США, начиная с 2000 г. на базе местных коз приступить к созданию коз молочного типа.

Однако развитие козоводства, в частности молочного, в коммерческих масштабах сдерживается отсутствием государственной поддержки фермерам, субсидирования отрасли и ученым в ведении племенной работы и разработке нормативно-технической документации на козье молоко.

Целью настоящей работы было изучение молочной продуктивности местных козематок и определение физико-химических свойств молока.

Материал и методика. Материалом для исследований явились местные неулучшенные, аборигенные козы с. Салли Ехегнадзорского района Вайоцдзорского марза. Местные козы обычно не относятся к каким-либо породам, являясь плодами народной селекции. В доступной нам литературе в Армении не были основательно изучены вопросы молочной и мясной продуктивности и химического состава молока и мяса коз. Козление маток в хозяйстве проходило в основном в март-апреле, дойку проводили, начиная с конца мая, по достижению козлят двухмесячного возраста. Для определения молочной продуктивности козематок за июнь-ноябрь (2003 г.) проводили контрольную индивидуальную дойку маток утром и вечером, или с целью определения количества товарного молока. Производительность молока козематок за всю лактацию рассчитывали по методике Багдасарова [1].

Из сборного дневного молока брали образцы и определяли количество жира, белка, сухого обезжиренного молочного остатка (СОМО), плотность и точку замерзания. Для этой цели использовали ультразвуковой анализатор молока “Екомилк” Милкана КАМ 98-2А. Полученные результаты обрабатывали методом вариационной статистики [5].

Результаты и обсуждение. Материалы исследования молочной продуктивности местных козематок свидетельствуют, что за период дойки месячная доля молока значительно варьирует. Так, в июне было получено 33,9 л молока, что составляет 26,38 % от общего товарного молока, а за июль – 27,42 %, т.е., за первые два месяца дойки от местных козематок было получено около 54 % товарного молока, тогда как за последние два месяца лактации было получено всего 11,22 % (рис.1).

За весь период дойки (165 дней) в среднем на одну козематку было получено 133,57 л молока (табл.1).

Однако за всю лактацию козематками было продуцировано 196,7 л молока (молочность за июнь умноженное на коэффициент 5,8). Следует констатировать, что коэффициент вариации молочности козематок очень высокий, т.е. на ферме никогда не проводилась какая-либо селекционно-племенная работа. Установлено, что при двойной дойке за день утренний удой козематок составляет 34-39% от суточного.

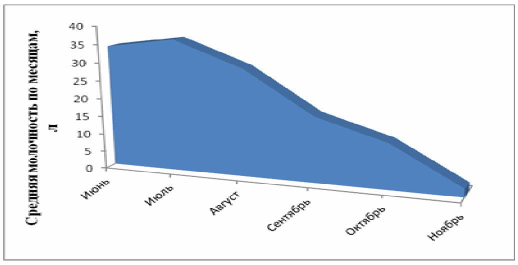


Рис.1. Средняя молочность местных коз по месяцам за 2003 год (л)

Табл. 1. Результаты контрольных доек местных козематок с. Салли за 2003 год, мл, суточный удой

Время контрольных доек	n	Lim	M±m	δ	C,%
10.06	68	300-1200	1010,8±42,8	353,5	34,83
25.06	70	250-1350	1246,5±47,6	396	31,77
10.07	70	250-2400	1130,0±40,9	343	30,35
25.07	70	350-2400	1230,5±46,3	388	31,53
13.08	70	300-2100	1106,0±41,9	351	31,91
27.08	69	200-1500	832,0±33,1	275,5	33,09
12.09	69	150-1200	670,0±29,2	243	36,27
27.09	68	200-1000	544,0±24,6	203	37,32
10.10	55	200-800	422,5±21,0	160	37,87
01.11	45	200-600	233,5±18,5	130	55,67

Средняя молочность по месяцам		Июнь	Июль	Август	Сентябрь	Октябрь	Ноябрь 1/2	За год
	Л	33,91	36,63	29,82	18,21	12,67	2,3	133,57
	%	26,38	27,42	22,32	13,63	9,48	1,74	100

По данным Мармаряна, Тер-Исаакяна, молочность местных козематок (в центре АРИД) за шесть месяцев составляла 118,16 л, а помесей (местная × альпийская) – 145,3 л [3].

В литературе есть сведения о том, что разница в молочной продуктивности высокоудойных коз молочной породы (зааненская) и беспородных коз весьма значительна: 1000 л молока в год против 200 л [12]. Глигвашвили [2] отмечает, что среднегодовой удой мегрельских коз разных популяций Грузии колеблется в пределах 181,84-296,14 кг. Таким образом, местные козы Армении (Вайоцдзорский марз) характеризуются типичной молочной продуктивностью, характерной для аборигенных коз Закавказья. Известно, что физико-химические показатели и технологические свойства молока оказывают определенное влияние на различные виды молочных продуктов, что представляет большой научный и практический интерес. Химический состав молока животных зависит от многих факторов: породы, возраста, сезона, кормления, состояния здоровья и т.д.

Усвояемость питательных веществ молока высокая: белков в среднем – 95%, углеводов – 98%. Более того, молоко стимулирует усвоение питательных веществ из других пищевых продуктов [6].

Физико-химический состав молока коз определяли в течение трех последующих месяцев дойного периода (2003 г.) (табл. 2).

Исследованиями установлено, что содержание сухих веществ в молоке коз в начале опыта (июнь) повышается от 14,92 до 16,92% (август), что в основном связано с содержанием и увеличением доли жира за этот период – с 4,87±0,09 до 7,14±0,26% ($p<0,01$).

Табл. 2. Физико-химические свойства молока местных коз с.Салли Вайоцдзорского марза.

Показатели	**Период лактации**								
	15.06.2003 (n±72)			15.07.2003 (n±45)			11.08.2003 (n±66)		
	Lim	M±m	C	Lim	M±m	C	Lim	M±m	C
Жир, %	3,0-7,0	4,8±0,09	15,8	4,5-9,5	6,1±0,17	18,69	4,5-10,0	7,14±0,26	29,69
Сухие вещества, %	12,2-18,0	14,92	----	13,0-20,0	15,97	----	13,0-21,0	16,92	----
Белок, %	3,0-4,5	3,8±0,02	5,0	3,5-4,5	3,75±0,11	15,8	3.01-4,5	3,73±0,03	5,63
СОМО, %	9,0-11,0	10,0±0,5	4,18	8,5-10,5	9,87±0,06	3,85	8,51-11,0	9,78±0,05	3,99
Плотность, г/см^3	1,03-1,03	1,034±0,0016	0,004	1,028-1,034	1,03±0,0007	0,004	1,027-1,034	1,03±0,0001	0,005
Точка замерзания, минус °С	0,60:0,69	0,64±0,002	0,03	0,58-0,65	0,62±0,002	0,02	0,57-0,65	0,60±0,002	0,02
Отношение жир/белок	1,0-1,55	1,28	----	1,29-2,11	1,62	-----	2,22	1,91	----

С июня по август содержание жира в молоке повышается на 46,6%, тогда как количество сухих веществ всего лишь на 13,4 %. В химическом составе молока содержание белка более стабильно и за исследуемый период колебалось в пределах 3,73-3,80 %, т.е. практически было неизменно. Соотношение жира и белка за этот период изменялось. Так, в начале экспериментального периода это соотношение составляло 1,28, а в конце – 1,91.

Шуварииков, Бодрова и Пастух отмечают, что содержание жира в молоке коз зааненской породы колебалось в пределах 3,4-3,6 %, белка – 3,18-3,23%, сухих веществ – 11,6-11,8%, лактозы – 4,19-4,37% [9]. Чикалев отмечает, что химический состав козьего молока зависит от породы [7]. Так например, молоко нубийских коз отличается исключительно высоким содержанием жира (8,5%) и сухих веществ (19,7%). По содержанию жира оно превосходит молоко буйволиц (7,5%), овец (6,7%), самок яка (6,5%) и зебу (5,2%), уступая только молоку оленя (22,5%) и крольчих (10,4%).

Таким образом, рассмотренные литературные данные достаточно противоречивы и не содержат однозначного ответа о видовых и породистых различиях в физико-химических свойствах молока. Полученные нами данные позволяют констатировать, что молочная продуктивность и физико-химические свойства местных коз Армении характеризуются средними величинами и динамично изменяются в течение лактации. Для более широкого использования молока в качестве сырья для производства молочных продуктов считаем необходимым дальнейшее глубокое изучение факторов, влияющих на физико-химический состав и физические свойства козьего молока. Полученные нами результаты могут быть использованы в селекционно-племенной работе по созданию молочного типа коз в Армении и перерабатывающими хозяйствами с целью повышения экономической эффективности козоводства. Материалы работы могут быть использованы также при разработке нормативно-технической документации (стандарты, технические условия) на козье молоко.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Багдасаров Г.Н.* Продуктивные и некоторые биологические особенности помесных овец Армении и влияние на них условий питания. Автореф. дисс. докт. с/х наук, Горский с/х ин-т, Ереван, 1971.
2. *Глигвашвили В.А.* Козоводство Грузии. Монография, автореф. на соиск. уч. степ. докт. с/х наук, Тбилиси, *21*, с. 13, 1998.
3. *Мармарян Ю.Г., Тер-Исаакян Л.Г.* Молочная продуктивность разводимых в Армении местных и помесных (F1) коз. Агрогитутюн, 7-8, с. 84-87, Ереван, 2009.
4. *Новопашина С.И., Санников М.Ю.* Состояние и перспективы молочного козоводства в Российской федерации. Овцы, козы, шерстяное дело, 4, с.10-13, 2010.

5. *Плохинский Н.А.* Биометрия, 2-е изд-е, изд-во Московского университета, с.367, 1970.
6. *Толкачева А.В.* Биоресурсный потенциал коров черно-пестрой и голштинской пород в условиях Зауралья. Курган. Дис. на соиск. уч. степ. канд. биол. наук, с.151, 2010.
7. Чикалев А.И. Козоводство. Горно-Алтайск, с.97-98, 2010.
8. *Шаталов В.А.* Этапы развития молочного козоводства в России. Овцы, козы, шерстяное дело, 4, 16-19, 2012.
9. *Шувариков А.С., Бодрова Ю.Н., Пастух О.Н.* Влияние производителей на физико-химические и технологические показатели молока коз зааненской породы. Овцы, козы, шерстяное дело, 1, с.5-6, 2011.
10. http://ru.wikipedia.org/wiki
11. http://farmerforum.ru/viewtopic.phpt
12. http://www.prinevskoe.ru/koza_work.htm1

Поступила 06.05.2013

Հայաստանի Գիտությունների Ազգային Ակադեմիա
Национальная Академия Наук Армении
National Academy of Sciences of Armenia

Հայաստանի Կենսաբանական Հանդես
Биологический Журнал Армении
Biological Journal of Armenia

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

Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 3(65), 2013

ԳԵԶԱԳԱՐԴԻ ԵՎ ԶԵՆԿՈՐԻ ԹՈՒՆԱԶՐԿՄԱՆ ԴԻՆԱՄԻԿԱՆ ԿԱՐՏՈՖԻԼԻ ՊԱԼԱՐՆԵՐՈՒՄ ՈՒ ՀՈՂՈՒՄ ԵՎ ՆՐԱՆՑ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՀՈՂԻ ՇՆՉԱՌՈՒԹՅԱՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Ս.Մ. ՍԱՐԳՍՅԱՆ, Ա.Լ. ԲԱԼԱՅԱՆ, Լ.Հ. ԱՃԵՄՅԱՆ

Սննդի անվտանգության ոլորտի ռիսկերի գնահատման
և վերլուծության գիտական կենտրոն
sonasargsyan@rambler.ru

Բացահայտված է, որ կարտոֆիլի պալարներում և հողում գեզագարդի համեմատ զենկորի միջոցով թունազրկումն ընթանում է առավել դանդաղ: Կարտոֆիլի պալարներում գեզագարդի ,սպասման ժամկետըե կազմում է 60 օր, զենկորինը՝ 90 օր:

Հաստատված է, որ հող ներմուծված հերբիցիդները (ստուգիչի համեմատ) առաջին երեք ամսում (մայիսից հուլիս) հավաստիորեն ճնշում են հողի շնչառության ուժգնությունը: Այնուամենայնիվ, հողում CO_2-ի անջատման ուժգնությունը հետագայում վերականգնվում է՝ գործնականում հավասարվելով ստուգիչի մակարդակին:

Գեզագարդ – զենկոր – կարտոֆիլ – սևահող – թունազրկում – հողի շնչառություն

Выявлено, что процесс детоксикации зенкором в почве и клубнях картофеля протекает значительно медленнее, нежели детоксикация гезагардом."Сроки ожидания" гезагарда в клубнях картофеля составляет 60 дней, зенкора – 90 дней.

Установлено, что интродуцированные в почву гербициды (по сравнению с контролем) на три месяца (с мая по июль) достоверно подавляют интенсивность дыхания почвы. Однако интенсивность выделения CO_2 в почве восстанавливается до уровня контроля.

Гезагард – зенкор – картофель – чернозем – детоксикация – дыхание почвы

The detoxification by gezagard in soil and in the tubes of potato takes place more slowly in compare with the detoxification by zencor. “Waiting period" in potato tubes for gezagard is 60 days, for zencor – 90 days.

It has been confirmed that the herbicides applied into the soil suppress reliably the activity of soil respiration in compare with the control test during the first three months (from May to July). However, the strength of CO_2 – emission from the soil is recovered then and practically equates the level of the control test.

Gezagard – zencor – potato – black earth – detoxification – soil respiration

Գյուղատնտեսական մշակաբույսերի մոլախոտերի դեմ պայքարի նպատակով ներկայումս լայնորեն կիրառվում են մի շարք արդյունավետ հերբիցիդներ, որոնց թվին են պատկանում նաև գեզագարդը և զենկորը: Հող ներմուծվելուց հետո հերբիցիդների մնացորդները բավականին երկար ժամանակ պահպանվում են հողում, իսկ դրանց մի մասը ներթափանցում է պաշտպանվող մշակաբույսերի մեջ, դրանով իսկ ստեղծելով որոշակի վտանգ մարդկանց առողջության համար: Հողում պահպանվող հերբիցիդների մնացորդները իրենց հերթին կարող են էապես ազդել նրա կենսաբանական ակտիվության, օգտակար միկրոֆլորայի, շրջակա միջավայրի վրա [10]:

Գյուղատնտեսական մշակաբույսերում և հողում պեստիցիդների, այդ թվում նաև հերբիցիդների, թունազրկման ակտիվությունը և տևողությունը կախված է մի շարք էկզոգեն և էնդոգեն գործոններից և կարող է էապես փոխվել պաշտպանվող մշակաբույսերի և հողի կենսաբանական ակտիվությունից, արտաքին պայմանների ազդեցությունից [11]:

Եթե մշակաբույսերի վրա հերբիցիդների ազդեցության մեխանիզմները ինչ-որ չափով ուսումնասիրված են, ապա հողի կենսաբանական ակտիվության, այդ թվում նաև շնչառության պրոցեսի վրա, հերբիցիդների ազդեցությունը համաշխարհային գրականությունում ոչ բավարար չափով է լուսաբանված: Մինչդեռ շնչառությունը կենսականորեն անհրաժեշտ պրոցես է և համարվում է հողի կենսաբանական ակտիվության կարևորագույն ցուցանիշը [3]:

Հողի շնչառության պրոցեսի արդյունքում առաջացող ածխաթթու գազի քանակությունը պայմանավորված է մի շարք գործոններով՝ մանրէների խտությամբ, օրգանական նյութերի կազմով և քանակությամբ, հողի ֆիզիկական վիճակով և բույսերի արմատային համակարգի շնչառության ակտիվությամբ [4, 7, 8, 9]:

Բնական է, որ հողում պարունակվող մանրէների գործունեության վրա կարող են ազդել ժամանակակից հերբիցիդները, որոնք աչքի են ընկնում կենսաբանորեն բարձր ակտիվությամբ [12]:

Ելնելով վերոհիշյալից, ներկայացվող աշխատանքի նպատակն է եղել ուսումնասիրել կարտոֆիլի տնկարկներում տարածված մոլախոտերի դեմ պայքարի համար կիրառվող գեզագարդի (ԽԿ, 500 մլ/լ) և զենկորի (ԹՓ, 700 գ/կգ) թունազրկման դինամիկան տիպիկ սևահողերում և պալարներում, ինչպես նաև նրանց ազդեցությունը հողի շնչառության պրոցեսի ինտենսիվության վրա:

Նյութ և մեթոդ: Հետազոտությունը կատարվել են 2011-2012 թթ.՝ լաբորատոր և դաշտային պայմաններում: Դաշտային փորձերը դրվել են Գեղարքունիքի մարզի Ճամբարակի համայնքի կարտոֆիլով զբաղեցված տիպիկ սևահողերում: Հերբիցիդներով ցողված և չցողված (ստուգիչ) տարբերակներն ունեցել են 5-ական կրկնողություն, յուրաքանչյուր տարբերակը 50 մ^2 ընդհանուր մակերեսով: Ցողումները կատարվել են մայիսի 15-ին Ozdesan մակնիշի մեջքի սրսկիչով՝ կարտոֆիլի սերմացուի տնկումից 6 օր անց: Աշխատանքային հեղուկի ծախսը կազմել է 3 լ/50 մ^2, իսկ գեզագարդի և զենկորի ծախսի նորմաները՝ համապատասխանաբար 15 մլ/50 մ^2 և 7գ/50 մ^2: Հետազոտություններն կատարվել են մայիսից սեպտեմբեր: Հերբիցիդներով ցողված և չցողված տեղամասերից առաջին հողանմուշները վերցվել են սրսկման օրը և այնուհետև յուրաքանչյուր ամսվա միևնույն օրը: Հերբիցիդների մնացորդային քանակները հողում և կարտոֆիլի պալարներում որոշվել են նրբաշերտ քրոմատոգրաֆիայի եղանակով [5, 6]: Շնչառությունը որոշվել է համաձայն մեթոդական ձեռնարկի [3]: Գիտափորձերում տարբերակներն ունեցել են 3-ական կրկնողություն:

Հետազոտության արդյունքները ենթարկվել են վիճակագրական վերլուծության [1, 2]:

Արդյունքներ և քննարկում: Գեզագարդի և զենկորի թունազրկմանը վերաբերող տվյալները վկայում են, որ կարտոֆիլով զբաղեցված տնկարկների հողում և պալարներում նրանց թունազրկման ինտենսիվությունը տարբեր է (աղ.1):

Աղ.1. Գեզագարդի և զենկորի թունազրկման դինամիկան հողում
և կարտոֆիլի պալարներում, մգ/կգ

Պատրաստուկ	Հետազոտության օբյեկտը	Օրերը սրսկումից հետո					
		0	30	60	90	120	140
Գեզագարդ	հող	3,0	0,24	հետքեր	չ/հ	-	-
	պալար	-	-	չ/հ	-	-	-
Զենկոր	հող	7,5	0,88	0,44	0,24	հետքեր	-
	պալար	-	-	0,40	0,18	հետքեր	չ/հ

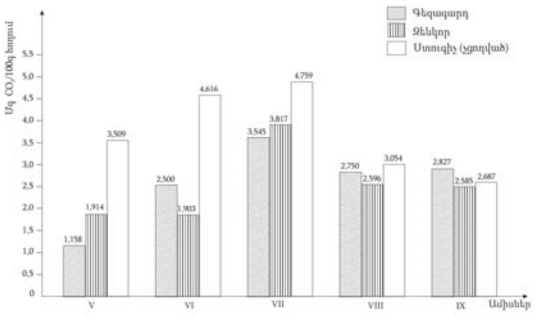
Ծանոթագրություն. չ/հ - չի հայտնաբերվել, " - " - անալիզ չի կատարվել

Ի տարբերություն զենկորի, գեզագարդի թունազրկումը և՛ հողում, և՛ պալարներում ընթանում է շատ ավելի արագ, ընդ որում արդեն ցողումից 2 ամիս անց պալարները լրիվ ազատվում են գեզագարդի մնացորդներից և դառնում անվտանգ օգտագործման համար:

Նշված ժամկետում հողում դեռևս հայտնաբերվում են գեզագարդի մնացորդներ, որոնք, սակայն, ի հայտ են գալիս լոկ հետքերի տեսքով:

Չնայած առաջին մեկ ամսում զենկորի մնացորդները հողում նվազում են 8,5 անգամ, սակայն հետագայում պատրաստուկի թունազրկման գործընթացը բավականին դանդաղ է ընթանում և նույնիկ 120 օր անց հողում դեռևս առկա են զենկորի մնացորդներ, ճիշտ է, միայն հետքերի տեսքով: Պալարներում ևս զենկորի թունազրկումը ընթանում է դանդաղ և հասնում առավելագույն թույլատրվող մակարդակի միայն կիրառումից 3 ամիս անց (այն կարտոֆիլի պալարներում հաստատված է 0,25 մգ/կգ):

Ստացված տվյալները հիմք են տալիս Գեղարքունիքի մարզի Ճամբարակի համայնքի տիպիկ սևահողերում տնկված կարտոֆիլի համար անվտանգության "սպասման ժամկետներ" սահմանել. գեզագարդ կիրառելիս՝ 60 օր, զենկոր կիրառելիս՝ 90 օր (նկ.1):



Նկ.1. Ածխաթթու գազի անջատման ուժգնությունը կարտոֆիլով տնկված տիպիկ սևահողերում հողային հերբիցիդներ ներմուծելուց հետո (2011-2012թթ. միջինը):

Նկ. 1-ից պարզորոշ երևում է, որ ստուգիչ (չցողված) տարբերակում CO_2-ի անջատման ուժգնացումը սկսվում է մայիսից (3,509 մգ CO_2/100գ հողում), առավելագույնի հասնում հունիսին (4,616 մգ CO_2/100 գ հողում) և հուլիսին (4,759 մգ CO_2/100գ հողում), այնուհետև նվազում օգոստոսից (3,054 մգ CO_2/100գ հողում) սեպտեմբեր (2,687 մգ CO_2/100 գ հողում), իսկ գեզագարդ և զենկոր տարբերակներում նշված ցուցանիշը մայիսից (համապատասխանաբար 1,158 մգ և 1,914 մգ CO_2/100 գ հողում) ուժգնանում է, առավելագույնի հասնում հուլիսին (համապատասխանաբար 3,545 և 3,817 մգ CO_2/100 գ հողում) և վերջիններիս համեմատ նվազում հետագա երկու ամիսներին (ընդհանրացված՝ 2,585-2,827 մգ CO_2/100 գ հողում):

Գրական աղբյուրների տեղեկատվությամբ բուսաճման շրջանում CO_2-ի անջատման ուժգնությունը ուղղակիորեն կախված է հողի խոնավությունից, ջերմությունից և մանրէների ընդհանուր քանակությունից [3, 7]:

Մեր փորձերում CO_2-ի անջատման դինամիկական փոփոխությունը մայիսից մինչև սեպտեմբեր հավանաբար պայմանավորված է վերոնշյալ գործոններով:

Վիճակագրական վերլուծության արդյունքներով հաստատված է, որ ցողման արդյունքում հող ներմուծված գեզագարդն ու զենկորը երեք ամսով (մայիս – հուլիս) ստուգիչի համեմատ հավաստիորեն ճնշում են CO_2-ի անջատման ինտենսիվությունը կարտոֆիլով զբաղեցված տիպիկ սևահողերում ($P_{0,95}$ և n=3-ի դեպքում Ստյուդենտի t չափանիշ-ի հաշվարկային ցուցանիշներ 5,577–13,242 > 3,182 Ստյուդենտի t չափանիշ-ի աղյուսակային ցուցիչից), իսկ օգոստոսին և սեպտեմբերին հերբիցիդներով ցողված և չցողված տարբերակներում ածխաթթվային գազի անջատման ինտենսիվությունների միջև արձանագրված չէ հավաստի տարբերություն (Ստյուդենտի t չափանիշ-ի հաշ-վարկային ցուցանիշներ 0,744 – 1,982 < 3,182 Ստյուդենտի t չափանիշ-ի աղյուսակային ցուցիչից): Փորձի սխալը քննարկված տարբերակ-ներում տատանվել է 2,3-4,5%-ի սահմաններում, ինչն էլ հաստատել է, որ գիտափորձերի արդյունքները հավաստի են:

Այսպիսով, ստացված տվյալները հիմք են տալիս Գեղարքունիքի մարզի Ճամբարակի համայնքի տիպիկ սևահողերում տնկված կարտոֆիլի համար անվտանգության ,սպասման ժամկետներե սահմանել գեզագարդ կիրառելիս՝ 60 օր, զենկոր կիրառելիս՝ 90 օր:

Ածխաթթվային գազի անջատման ուժգնությունը գեզագարդով, զենկորով առանձին ցողված և չցողված (ստուգիչ) կարտոֆիլով զբաղեցված սևահողերում մայիսից սեպտեմբեր կրել են դինամիկ փոփոխություն:

Ցողված հերբիցիդները ստուգիչի համեմատ կարտոֆիլով զբաղեցված տիպիկ սևահողերում երեք ամսով (մայիսից հուլիս) հավաստի ճնշել են CO_2-ի անջատման ուժգնությունը, որից հետո (օգոստոս-սեպտեմբեր) նշյալ հողերն ըստ էության ունեցել են շնչառության ուժգնության նույնական ցուցանիշ:

Էկոլոգիական տեսանկյունից գեզագարդն ու զենկորը շնչառության ուժգնության վրա գործնականում ցուցաբերում են միանման ազդեցություն:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. *Ашмарин И.П., Воробьев А.А.* Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л., Медгиз, 180 с., 1962.
2. *Бернстейн А.* Справочник статистических решений. М., Статистика, 162 с., 1968.
3. *Галстян А.Ш.* Ферментативная активность почв Армении. Ереван, Айастан , В. VIII, 275 с., 1974.
4. *Имшенецкий А.А.* Микробиология целлюлозы. М., АН СССР, 438 с., 1953.
5. Методы определения микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах и внешней среде. М., Колос, 368 с., 1977.
6. Методические указания по определению микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах и внешней среде., Ч. XII, с. 111-118, 1982.
7. *Некрасова В.Д., Гукасян А.Б.* Биологическая активность лесных почв Тувы. Новосибирск, Наука, с. 35-38, 1978.
8. *Омелянский Б.Л.* Краткий курс общей и почвенной микробиологии. М.-Л., Сельхозгиз, 183 с., 1931.
9. *Руссель С.* Микроорганизмы и жизнь почвы. М., Колос, с. 97-99, 1977.
10. *Goux S. J., Shapir N., El Fantroussi S., Lelon G.S., Agathos S.N., Pussemier L.* Long-term maintenance of rapid atrazine degradation in soils inoculated with atrazine degraders. Water, Air & Soil Pollution: Focus, *3*, p. 131, 2003.
11. *Krutz L.J., Senseman S.A., Haney R.I.* Effects of Roudup Ultra on atrazine degradation in soil. Biol. Fertil. Soils. *38*, p. 115, 2003.
12. *Lin C.H., Lerch R.N., Kremer R.J., Garrett H.E., Udawatta R.P., George M.F.* Soil microbiological acti-vities in vegetative buffer strips and their association with herbicide degradation. AFTA. Conference Proceedings, 10 p., 2005.

Ստացվել է 30.01.2013

Հայաստանի Գիտությունների Ազգային Ակադեմիա
Национальная Академия Наук Армении
National Academy of Sciences of Armenia

Հայաստանի Կենսաբանական Հանդես
Биологический Журнал Армении
Biological Journal of Armenia

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

Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 3(65), 2013

PARAMECIUM CAUDATUM ԻՆՖՈՒԶՈՐԻԱՅԻ ԵՎ ԷՆՑԵՖԱԼՈՄԻՈԿԱՐԴԻՏԻ ՎԻՐՈՒՍԻ ՓՈԽՀԱՐԱԲԵՐՈՒԹՅԱՆ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒՄԸ

Ն.Վ. ԲԱՅՐԱՄՅԱՆ

ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտ
Բջջային կենսաբանության լաբորատորիա
naneramaz@mail.ru

Էնցեֆալոմիոկարդիտի վիրուսի և *Paramecium caudatum* ինֆուզորիաների կոինկուբացման ուսումնասիրության ժամանակ հայտնաբերվել է ինֆուզորիաների քանակի հավաստի ավելացում կենդանի վիրուսի առկայության պայմաններում: Պարամեցիումի քանակական աճը էն-ցեֆալոմիոկարդիտի վիրուսի առկայությամբ հնարավոր չէ բացատրել միայն նրանով, որ վիրուսը ինֆուզորիաների համար սննդի աղբյուր է ծառայում: Դրա մասին է վկայում, սննդային միջավայր ինակտիվ վիրուսներ ներմուծելու ժամանակ ինֆուզորիաների քանակի աննշան ավելացումը:

Ինֆուզորիաների քանակի աճմանը զուգահեռ տեղի է ունենում վիրուսի տիտրի նվազում, որը կենդանի ինֆուզորիայի հետ կոինկուբացման դեպքում կապված չէ վերջինիս պրոտեոլիտիկ ֆերմենտների հետ, քանի որ, ինֆուզորիաների լիզատները ազդեցություն չեն ցուցաբերում վիրուսի տիտրի վրա:

Paramecium caudatum – էնցեֆալոմիոկարդիտի վիրուս

При исследовании коинкубации вируса энцефаломиокардита с инфузорией *Paramecium caudatum* выявлено достоверное увеличение численности инфузорий в присутствии живого вируса. Рост численности парамеций в присутствии вируса энцефаломиокардита невозможно объяснить только тем, что последний служит лишь источником пищи для инфузорий. Об этом свидетельствует незначительное возрастание численности инфузорий при внесении в среду инактивированных вирусов.

Одновременно с ростом численности инфузорий происходит снижение титров вируса, которое при инкубации с живыми инфузориями не связано с протеолитическими ферментами инфузорий, так как лизаты последних не оказывали влияния на инфекционные титры вируса.

Paramecium caudatum – вирус энцефаломиокардита

The quantity of infusorias increased during the coincubation of Encephalomyocarditis virus° with infusoria *Paramecium caudatum*. This phenomenon is not a result of the explanation in accordance with *Paramecium* is food source for infusorias. This is supported by that fact that quantity of infusorias increased when we add the same amount of inactivated virus into the medium.

Along with the increasing number of infusoria the viral titers was reduced. This decrease is not associated with proteolytical effect of infusoria's enzymes, because infusorias lysates do not influence on infectious virus titers.

Paramecium caudatum – Encephalomyocarditis virus

Վիրուսներն, ինչպես նաև այլ միկրոօրգանիզմներ, կարող են սիմբիոզի մեջ մտնել տարբեր նախակենդանիների հետ՝ ստեղծելով նախակենդանիվիրուս համակարգ, որը կարող է ունենալ մեծ դեր վիրուսի էկոլոգիայի տեսանկյունից [5, 9, 11, 12]:

Այդ համակարգում մի կողմից նախակենդանիները կարող են հանդիսանալ տեր կամ

շտեմարան վիրուսների համար, մյուս կողմից՝ վերջիններս կարող են ինակտիվացվել նախակենդանիների կողմից [2, 3]: Այդ համակարգում առավելապես հետաքրքիր են վիրուս – նախակենդանիներ փոխհարաբերությունները, քանի որ ինֆուզորիաները պատկանում են ամենատարածված նախակենդանիների շարքին:

ԷՄԿ պիկոռնավիրուսը համարվում է մարդու և կենդանիների վտանգավոր հիվանդությունների հարուցիչ [7]: Այն կարող է առաջացնել համաճարակ և գյուղատնտեսական կենդանիների զանգվածային մահածության պատճառ հանդիսանալ [14]: Աշխատանքի նպատակն է եղել պիկոռնավիրուսի էկոլոգիայի ուսումնասիրումը և դրա կենսաշրջանառությունը նախակենդանի վիրուս համակարգում:

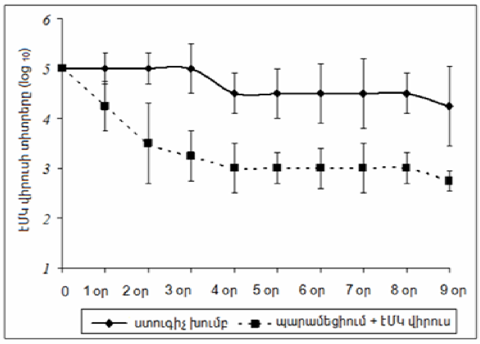
Նյութ և մեթոդ: Աշխատանքում օգտագործվել են *Paramecium caudatum* ինֆուզորիաներ, որոնք աճեցվել են 22 ^{0}C-ում Losina-Losinsky միջավայրում (աղային լուծույթ) [10]: Փորձերի համար ինֆուզորիաները ինկուբացվել են վիրուսի հետ 22^{0}C-ում նույն *Losina-Losinsky* միջավայրում: Զուգահեռ ստեղծվել է նաև ինֆուզորիաներից զատ (միայն վիրուսով) ստուգիչ խումբ: Ինֆուզորիաների ինակտիվացումը և քայքայումը կատարվել է երեք անգամ՝ վերջիններիս սառեցման/ապասառեցման եղանակով:

Աշխատանքում օգտագործվել է ԷՄԿ վիրուսի Columbia-SK շտամը: ինֆուզորիաներով Losina-Losinksy միջավայր ներմուծվել է 5,0 log TCD 50/մլ չափաբաժնով վիրուս: Ինֆուզորիա-ԷՄԿ վիրուսը կոինկուբացվել է 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 ժ: Յուրաքանչյուր ժամվա (24 ժ) ինֆուզորիա-ԷՄԿ վիրուս կուլտիվացված միջավայրից վերցվել են փորձանմուշներ և տիտրվել RD (մարդու ռաբդոսարկոմայի տրանսֆորմացված բջիջներ) բջջային կուլտուրայի վրա: Վիրուսի տիտրը որոշվել է KՊrber-ի մեթոդով [4]: Վիրուսի ինակտիվացումը կատարվել է ջերմային եղանակով՝ միջավայրի ջերմությունը 60 ^{0}C, տևողությունը 50 րոպե: Ի սկզբանե, ինակտիվացված վիրուսի չափաբաժինը եղել է նույնը, ինչ որ փորձարարական խմբում: Նույնն է եղել նաև *P. caudatum* ինֆուզորիաների և ինակտիվացված վիրուսի ինկուբացման ժամանակը:

Աշխատանքում օգտագործվել է RD բջջային կուլտուրա, որն աճեցվել է Eagle MEM միջավայրում՝ ավելացրած խոշոր եղջերավոր կենդանու 10%-անոց շիճուկ: Փորձերն կատարվել են 36-36.5$^{\prime}$C ջերմաստիճանում:

Բոլոր ուսումնասիրությունները կատարվել են վեց չափանիշի կրկնությամբ: Վիճակագրական վերլուծությունը կատարվել է ըստ Ստյուդենտի:

Արդյունքներ և քննարկում: Ուսումնասիրվել է սննդային միջավայրում կենդանի ինֆուզորիաների ազդեցությունը վիրուսի տիտրի և վարակի ակտիվության վրա: Ինչպես երևում է նկ. 1-ից՝ ինֆուզորիաների հետ կոինկուբացիայի ընթացքում վիրուսի տիտրը նվազում է ստուգիչ խմբի հետ համեմատած: ԷՄԿ վիրուսի տիտրի նվազումը սկսվում է կուլտիվացումից 24 ժ հետո և տևում է 4 օր, կուլտիվացման 6-րդ օրը հասնում է՝ 4-4.7 log TCD 50/մլ, իսկ 9-րդ օրվա կուլտիվացման ընթացքում ԷՄԿ վիրուսի տիտրը իջնում է 4,25 log TCD 50/մլ: Պարամեցիումի հետ կոինկուբացման ժամանակի ավելացմանը զուգահեռ՝ վերը նշված պիկոռնավիրուսի վարակի ակտիվությունը նվազում է:



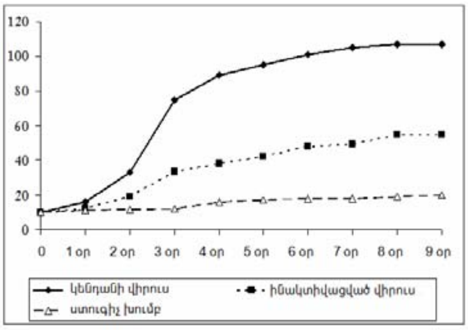
Նկ.1. ԷՄԿ վիրուսի տիտրի նվազումը *P. caudatum* ինֆուզորիաների հետ կոինկուբացման ընթացքում

Կատարվել է *P.caudatum* ինֆուղորիաներիի լիզատներում ԷՄԿ վիրուսի տիտրի դինամիկայի վերլուծություն: Համաձայն մեր ստացված տվյալների՝ ԷՄԿ վիրուսի տիտրերը քայքայված ինֆուզորիաներով միջավայրում չի փոխվել դիտարկման ամբողջ ժամանակահատվածում:

Աղ.1. Էնցեֆալոմիոկարդիտ վիրուսի տիտրի դինմիկան *P. caudatum* ինֆուզորիաների լիզատներում

Կոինկուբացման օրերը	ԷՄԿ վիրուս ստուգիչ խումբ	ԷՄԿ-ի վիրուսի կոինկուբա-ցումը քայքայված *P. caudatum*-ի հետ
0	5	5
1	5	5
2	5	5
3	5	5
4	4,5	4,5
5	4,5	4,5
6	4,5	4,5
7	4,5	4,25
8	4,5	4,25
9	4,25	4,25

Ուսումնասիրվել է *P.caudatum*-ի քանակական փոփոխությունը ակտիվ և ինակտիվ ԷՄԿ վիրուսի կոինկուբացման ընթացքում: Ստացված արդյունքները ամփոփված են նկ. 2-ում:



Նկ.2. *P. caudatum* ինֆուզորիաների քանակական փոփոխությունը
ԷՄԿ վիրուսի հետ կոինկուբացման ընթացքում

Ինչպես երևում է նկ. 2-ից՝ ինֆուզորիաները ԷՄԿ վիրուսի փոխազդեցության պայմաններում հասնում են աճման ավելի բարձր մակարդակի, քան առանձին պայմաններում: Դրանց քանակը ստուգիչ խմբի հետ համեմատած տալիս է զգալի տարբերություն սկսած ինկուբացման 3-րդ օրից (ստուգիչ խումբ՝ 12.0˚1.8, փորձարարական խումբ՝ 74.6˚15.4 t=4.10, ($p<0.01$), ինակտիվացված վիրուսով՝ 33,4˚2,9 (ստուգիչ խմբի հետ $p<0,05$, փորձարարական խմբի հետ $p<0,01$) մինչև 5-րդ օրը և պահպանվում է մինչև 9-րդ օրը (ստուգիչ խումբ՝ 20,0˚4,3, փորձարարական խումբ՝ 107,0˚16,3 ($p<0,01$), ինակտիվացված վիրուսով՝ 55,1˚10,2 (ստուգիչ խմբի հետ $p<0,05$, փորձարարական խմբի հետ $p<0,01$): Ինակտիվ վիրուսի ազդեցությամբ ինֆուզորիաների քանակը քիչ է ավելանում ստուգիչ խմբի ինֆուզորիաների քանակի համեմատ:

Նախակենդանիների օրգանիզմում պիկոռնավիրուսների պահպանման հնարավորությունների մասին ապացույցները հաստատված են որոշ աշխատանքներում [8, 13], - սակայն պիկոռնավիրուսների և թարթիչավորների միջև փոխհարաբերությունների առանձնահատկությունները դեռևս պարզաբանված չեն: Մի շարք գիտնական- ներ առաջարկեցին *Tetrahimena pyriformis* ինֆուզորիայի և պոլիոմելիթի միջև փոխհարաբերության չեզոք ձև, սակայն հետագայում ցույց տրվեց, որ պոլիոմիելիթը կարող է բազմանալ *T.pyriformis*-ի մեջ [8]: Բացի այդ գոյություն ունեն շատ հակասական փաստեր: Այսպես, որոշ բակտերիոֆագեր, ինչպիսիք են՝ PhiX174 և MS2 կայուն են *T. pyriformis*-ի կողմից ինակտիվացմանը [1]: Սակայն ցույց է տրվել, որ T4 բակտերիոֆագը ինակտիվացվում է նույն ինֆուզորիայի կողմից [6]: Գրականության մեջ Էնցեֆալոմիոկարդիտ վիրուսի և *P. caudatum*-ի փոխհարաբերությունների վերաբերյալ տվյալներ գրեթե չկան: Էնցեֆալոմիոկարդիտի և ինֆուզորիայի միջև եղած փոխհարաբերությունը նկարագրված է *T. pyriformis* ինֆուզորիայի օրինակով [8]:

Այսպիսով, ստացված տվյալները ցույց են տալիս, որ կենդանի ինֆուզորիաներով միջավայրում ԷՄԿ վիրուսի ինակտիվացումը կատարվում է ավելի արագ, քան ինֆուզորիայի լիզատների փոխազդեցության պայմաններում (նկ.1, աղ. 1): Սա ապացուցում է, որ վերջիններս միմյանց հետ մտնում են որոշ փոխազդեցության մեջ: Կատարված փորձերից կարելի է ենթադրել, որ ինֆուզորիաները ինակտիվացնում են ԷՄԿ վիրուսը այն միջավայրում, որտեղ տեղի է ունեցել կոինկուբացումը: Վիրուսի ինակտիվացումը պայմանավորված չէ ինֆուզորիաների պրոտեոլիտիկ ֆերմենտների ազդեցությամբ, քանի որ էնցեֆալոմիոկարդիտի և քայքայված ինֆուզորիաների համատեղ կոինկուբացման պայմաններում չեն առաջանում վիրուսի տիտրի էական տարբերություններ: Պարզվել, որ կենդանի ինֆուզորիայի և վիրուսի կոինկուբացման ընթացքում, որ վիրուսային տիտրերի նվազմանը զուգընթաց ավելանում է ինֆուզորիաների քանակը: Այս երևույթը պայմանավորված չէ միայն վիրուսին՝ որպես սննդային աղբյուր օգտագործելու փաստով, քանի որ համաձայն մեր տվյալների՝ ինակտիվ վիրուսներ ներմուծելով սննդային միջավայր ինֆուզորիաների քանակը շատ քիչ է ավելանում ստուգիչ խմբի համեմատ:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. *Akunyili A.A., Alfatlawi M., Upadhyaya B., Rhoads L.S., Eichelberger H, Van Bell C.T.* Ingestion without inactivation of bacteriophages by Tetrahymena. J. Eukaryot. Microbiol., *55*, 3, 207-213, 2008.
2. *Bettarel Y., Amblard C., Sime-Ngando T., Carrias J.-F., Sargos D., Garabetian F. & Lavandier P.* Viral lysis, flagellate grazing potential and bacterial production in Lake Pavin: a short-term study. Microbial Ecology, *45*, 119-127, 2003.
3. *Blawat F., Kowalska Z.* Investigations *in vitro* on the influence of some amoeba on survival of poliomyelitis virus . Bull. Inst. Marine Med. In Gdansk. *14*, p. 15-24, 1963.
4. *Finney J.* Statistical Method in Biological Assay. Hafner Publishing Co., N.Y.
5. Gastrich M.D., Anderson O.R., Sh.S. Benmayor, and E.M. Cosper Ultrastructural analysis of viral infection in the brown-tide alga, Aureococcus anophagefferens (Pelagophyceae). Phycologia: July 1998, *37*, 4, pp. 300-306, 1952, 1998.
6. *Hennemuth W., Rhoads L.S., Eichelberger H., Watanabe M., Van Bell K.M., Ke L, Kim H, Nguyen G, Jonas J.D., Veith D., Van Bell C.T.* Ingestion and inactivation of bacteriophages by Tetrahymena. J. Eukaryot. Microbiol. 55, 1, 44-50, 2008.
7. *Kirkland, P.D., Gleeson, A.B., Hawkes, R.A., Naim, H.M., Broughton. C.R.* Human infection with encephalomyocarditis virus in New South Wales. Med. J. Aust., 151, 176-177, 1989.
8. *Kovacs E., Bucz B.* Propagation of mammalian viruses in protista. II. Isolation of complete virus from yeast and Tetrahymena experimentally infected with picorna viral particles or their infectious RNA. Life Science, 1967, v 6, 347-358
9. *Lawrence, J. E., A. M. Chan, and C. A. Suttle.* A novel virus (HaNIV) causes lysis of the toxic bloom-forming alga Heterosigma akashiwo (Raphidophyceae). J. Phycol. *37*, 216-222, 2001.
10. *Losina-Losinsky L.K.,* Zur Ernährungsphysiologie der Infusorien. Untersuchungen über die Nahrungsmittel und Vermehrung beiParamecium caudatum. Arch. Protistenk. *74*, 18–20, 1931.
11. *Schroeder, D.C., J. Oke, G. Malin, and W.H. Wilson.* Coccolithovirus (Phycodna-viridae): characterisation of a new large dsDNA algal virus that infects Emiliania huxleyi. Arch. Virol. *147*, 1685-1698, 2002.
12. *Takao Y., Nagasaki K., Mise K., Okuno T., Honda D.* Appl. Environ. Microbiol. Isolation and Characterization of a Novel Single-Stranded RNA Virus Infectious to a Marine Fungoid Protist, Schizochytrium sp. (Thraustochytriaceae, Labyrinthulea), *71*, p. 4516-4522, 2005.
13. *Teras J., Kesa L., Kallas E., Jogiste A.* On the relationship between some free-living and parasitic protozoa and the DNA and RNA-viruses. Abstr. V. Intern. Congr. Protozool. New-York, p446, 1977.
14. *Yamada T., Matsumori A., Wang W.Z., Ohashi N., Shiota K., Sasayama S.* Heart Vessels. Apoptosis in congestive heart failure induced by viral myocarditis in mice. *14*. p. 29-37, 1999.

Ստացվել է 25.03.2013

Հայաստանի Գիտությունների Ազգային Ակադեմիա | Հայաստանի Կենսաբանական Հանդես
Национальная Академия Наук Армении | Биологический Журнал Армении
National Academy of Sciences of Armenia | Biological Journal of Armenia

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

Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 3(65), 2013

ԼՈՌՎԱ ՍԱՐԱՀԱՐԹԻ ՋՐԱՃԱՀՃԱՅԻՆ ՖԼՈՐԱՅԻ ԿԱՐԳԱԲԱՆԱԿԱՆ ՎԵՐԼՈՒԾՈՒԹՅՈՒՆ

Ա.Ա. ԹՈՒՄԱՆՅԱՆ

Վանաձորի պետական մանկավարժական ինստիտուտ
arusyaktumanyan@mail.ru

Կատարվել է Լոռվա սարահարթի ջրաճահճային ֆլորայի կարգաբանական վերլուծություն, որն ընդգրկում է անոթավոր բույսերի 178 տեսակ, որոնք պատկանում են 34 ընտանիքների 78 ցեղերի: Ուսումնասիրության համաձայն Լոռվա սարահարթի ջրաճահճային ֆլորան իր կարգաբանական կառուցվածքով հանդիսանում է Հոլարկտիկական թագավորության Բորեալ ենթաթագավորության Կովկասյան ֆլորիստիկական մարզի կազմի մեջ մտնող Լոռու ֆլորիստիկական շրջանի բաղադրիչ մասը և դրա հետ մեկտեղ կրում է գերխոնավ բնակատեղերի պարցիալ ֆլորաներին առանձնահատուկ գծերը:

Պարցիալ ֆլորա – կարգաբանական վերլուծություն – ընտանիքների սպեկտր – ցեղերի սպեկտր

Проведен таксономический анализ водно-болотной флоры Лорийского плато, включающей 178 видов сосудистых растений, относящихся к 78 родам из 34 семейств. Результаты исследований позволяют заключить, что водно-болотная флора Лорийского нагорья по своей таксономический структуре является составной частью Лорийского флористического района, входящего в состав Кавказской флористической области Бореального подцарства Голарктического царства, но при этом несет специфичные черты парциальной флоры переувлажненных местообитаний.

Парциальная флора – таксономический анализ – спектр семейств – спектр родов

There has been a taxonomik analysis carried out on the Lori plateau wetland flora, which includes 178 species of vascular plants belonging to 78 genera of 34 families. As a result of this research it can be concluded that according to its taxonomic structure the wetland flora of Lori plateau is part of the Lori floristic region component which is in the Caucasian province of Boreal sub-realm of Holarctic realm, but it has specific features of the partial flora of wetland habitats.

Partial flora – taxonomic analysis – spectrum of families – spectrum of genera

Լոռվա սարահարթը գտնվում է համանուն մարզի հյուսիսային հատվածում, Բազումի, Ջավախքի լեռնաշղթաների ու Վիրահայոց (Սոմխեթական) լեռների միջև: Ծովի մակերևույթից միջին բարձրությունը 1450 մ է: Ընկած է Տաշիրի և Ստեփանավանի տարածաշրջաններում՝ ձգվելով հյուսիս-արևմուտքից դեպի հարավ-արևելք [3, 11]: Լոռվա սարահարթը ծածկված է վերին պլիոցենի և անթրոպոցենի անդեզիտաբազալտներով, բազալտներով, ֆլյուվիոգլացիալ և պրոլյուվիալ նստվածքներով [11]: Լոռվա սարահարթն ունի համեմատաբար մեղմ կլիմա: Ամառը զով է, ձմեռը՝ ոչ շատ ցուրտ, իսկ տեղումների քանակը՝ միանգամայն բավարար տափաստանային բուսականության աճման համար: Ամենացուրտ ամսվա (հունվար) միջին ջերմաստիճանը այստեղ -5,1^{0}C է (Տաշիր), իսկ ամենատաք (օգոստոս) ամսվանը՝ 16.8^{0}C (Ստեփանավան): Լոռվա սարահարթում տարեկան թափվում են 680-720 մմ տեղումներ [3]:

Լոռվա սարահարթը ծածկված է գլխավորապես լեռնատափաստանային տիպիկ սևահողերով, բավարար տեղումների արդյունքում զարգանում են կրազուրկ սևահողերը:

Տաշիրի տարածաշրջանում սևահողերի տարածման շրջաններում տեղ–տեղ հանդիպում են ճահճացած տորֆահողեր: Ստեփանավանի և մասամբ Տաշիրի տարածաշրջանների 900-2100 մ բարձրություններին բնորոշ են լեռնաանտառային հողերը, որոնք գենետիկական հատկանիշների հիման վրա բաժանվում են 3 տիպի՝ դարչնագույն, գորշ և հումուսակարբոնատային [2, 3]: Համաձայն Թախթաջյանի բուսա-աշխարհագրական շրջանացման Լոռվա սարահարթը գտնվում է Լոռու ֆլորիստիկական շրջանի հյուսիսային հատվածում, որն ընդգրկվում է Հոլարկտիկական թագավորության Բորեալ ենթաթագավորության Կովկասյան ֆլորիստիկական մարզի կազմում [15, 16]: Այս ֆլորիստիկական շրջանի բնակլիմայական պայմանները խորապես ազդել են ջրաճահճային բուսականության կազմի ձևավորման վրա:

Հաշվի առնելով Լոռվա սարահարթի երկրաբանական պատմությունը և Լոռվա լճերի բուսականության ֆլորիստիկ կազմը, կարելի է ենթադրել, որ Լոռվա ջրային բուսականությունն ունի ռելիկտային բնույթ: Այն առաջացմամբ հավանաբար կապված է սառցե ժամանակաշրջանի հետ [14]:

Նյութ և մեթոդ: Այս աշխատանքի համար նյութ են հանդիսացել 2007-2012 թթ. Ընթացքում Լոռու ֆլորիստիկական շրջանի հյուսիսային հատվածում գտնվող Լոռվա սարահարթի լճերում մեր կողմից կատարված ուսումնասիրությունները՝ մարշրուտային և կիսաստացիոնար մեթոդներով: Օգտագործվել են ՀՀ ԳԱԱ Բուսաբանության ինստիտուտի ,Բույսերի կարգաբանության և աշխարհագրությունե բաժնում (ERE) և Երևանի պետական համալսարանում (ERCB) պահպանվող հերբարիումային հավաքածուների համապատասխան օրինակները: Մեր կողմից օգտագործվել են նաև գրականության տվյալներ, որոնք բերվում են ,Հայաստանի ֆլորանե [22], ,Կովկասի ֆլորանե [7] աշխատություններից, ինչպես նաև Թուրքիայի և Իրանի ֆլորաներից: Ֆլորայի քանակական վերլուծությունը կատարվել է համաձայն Տոլմաչովի [17-19] և Կամելինի [8] առաջարկած մեթոդների:

Արդյունքներ և քննարկում: Հետազոտվող ֆլորան զարգանում է գերխոնավ բնակատեղում, որն ամբողջությամբ իրենից ներկայացնում է ջրային ու ճահճային բուսականության ֆլորոցենոտիպ, և կարող է համարվել պարցիալ ֆլորա [25, 26]: Դրա հետ կապված այն կարող է ենթարկվել ֆլորիստիկական անալիզի և համեմատվել Հայաստանի այլ շրջանների պարցիալ ֆլորաների հետ: Ինչպես կտեսնենք ստորև, ուսումնասիրվող ֆլորան բավականին առանձնահատուկ է և իր կազմով, և տարրերի փոխհարաբերությունով, ինչպես նաև կտրուկ տարբերվում է Հայաստանի այլ պարցիալ ֆլորաներից և առանձին շրջանների ֆլորաներից ամբողջապես [1, 4, 5, 12, 20]:

Այս հոդվածում բերվում են տվյալներ Հյուսիսային Հայաստանի Լոռու մարզի Լոռվա սարահարթի ջրաճահճային ֆլորայի միայն կարգաբանական վերլուծության վերաբերյալ: Հետազոտվող ողջ ֆլորան իր մեջ ներառում է 178 տեսակ, որոնք պատկանում են 34 ընտանիքների 78 ցեղերին [24]: Առաջին հերթին ուշադրություն ենք դարձնում տեսակների բաշխվածությանը կարգաբանական բարձր կատեգորիաներում (աղ. 1), ըստ որի բարձրակարգ սպորավորներից առկա է միայն մեկ տեսակ (*Salvinia natans* L.), որն ընդգրկված է ՀՀ Բույսերի Կարմիր գրքում [9, 10] և 2 տեսակ հատվածավորներից (*Equisetum arvense* L., *E. palustre* L.): Մնացած տեսակները պատկանում են ծածկասերմերին, որում գրեթե հավասար են միաշաքիլները և երկշաքիլները (միաշաքիլների գերակշռությամբ): Հետազոտվող ֆլորայի հետևյալ հատկանիշն էլ առանձնացնում է նրան Հայաստանի այլ պարցիալ ֆլորաներից, որոնցում ճնշող մեծամասնությամբ գերիշխում են երկշաքիլները:

Աղ.1. Լոռվա սարահարթի ջրաճահճային ֆլորայի տաքսոնոմիական խոշոր միավորների

Տաքսոն	Տեսակների քանակը	%
Բարձրակարգ սպորավորներ կամ պտերանմաններ	1	0.56
Հատվածավորներ	2	1.12
Ծածկասերմեր	175	98.3
Միաշաքիլներ	94	52.8
Երկշաքիլներ	81	45.5

Լոռվա սարահարթի ջրաճահճային ֆլորայի սպեկտրալ վերլուծությունը ըստ ընտանիքների (աղ. 2) ցույց է տալիս, որ Երկիր մոլորակի բարեխառն շրջաններում առավել հարուստ ներկայացված առաջատար և կոսմոպոլիտ է համարվում Cyperaceae ընտանիքը [19]:

Սա համարվում է հետազոտվող ֆլորայի առավել բնութագրական հատկանիշը, որը կատարելապես կապված է բնակատեղի յուրահատկությունների հետ: Գործնականում բոլոր այլ բնակատեղերում համապատասխանաբար պարցելային ֆլորաների սպեկտրում գերիշխում է Asteraceae ընտանիքը: Մեր ֆլորայի սպեկտրում երկրորդ տեղը զբաղեցնում է Poaceae ընտանիքը, որը նույնպես կոսմոպոլիտ է, և Երկիր մոլորակի արևադարձային շրջաններում առանձնանում է տեսակների բազմազանության առանձնահատկությամբ: Այս ընտանիքի բարձրակարգ տեղ գրավելը բնութագրական է Մարմարիկ գետի ավազանի [23] և Հայաստանի հյուսիսային շրջանների ֆլորիստիկական մարզերի [21] համար նույնպես, որոնցում այն սովորաբար զբաղեցնում է երկրորդ տեղը Asteraceae ընտանիքից հետո և գերիշխում է Fabaceae ընտանիքի նկատմամբ, որը Հարավային Հայաստանում ներկայացվում է առավել հարուստ և այդ ֆլորայի սպեկտրում գրավում է երկրորդ տեղը:

Աղ.2. Լոռվա սարահարթի ջրաճահճային ֆլորայի ընտանիքների սպեկտրը

№	Ընտանիք	Տեսակների քանակ	%	Ցեղերի քանակ	%
1	Cyperaceae	30	16.8	6	7.7
2	Poaceae	22	12.4	14	17.9
3-4	Potamogetonaceae	11	6.2	1	1.3
3-4	Rosaceae	11	6.2	5	6.4
5	Juncaceae	10	5.6	2	2.6
6	Brassicaceae	9	5.1	5	6.4
7	Polygonaceae	8	4.5	2	2.6
8-9	Lamiaceae	7	3.9	5	6.4
8-9	Orchidaceae	7	3.9	3	3.8
10		6	3.4	3	3.8
	10 ընտանիքների արդյունք	121	67.9	46	58.9
	Ընտանիքներ, որոնք ներառում են 2-5 տեսակներ	48	26.9	23	29.6
	Ընտանիքներ, որոնք ներառում են 1տեսակ	9	5.1	9	11.5
		178	100	78	100

Երրորդ և չորրորդ տեղերը տեսակների հավասար թվաքանակով զբաղեցնում են Potamogetonaceae և Rosaceae ընտանիքները: Նրանցից առաջինը կոսմոպոլիտ ընտանիք է, որի բոլոր ներկայացուցիչները քաղցրահամ ջրամբարների բնակիչներ են, և զարմանալի չէ այս ընտանիքի գրեթե բոլոր հայկական ներկայացուցիչների հանդիպումը Լոռվա սարահարթի ջրային ապրելավայրերում: Ի տարբերություն Մարմարիկ գետի ավազանի և Սևանի ավազանի, որոնցից առաջինում Potamogetonaceae ընտանիքից առկա է ընդամենը 3 տեսակ [23], իսկ երկրորդում՝ 7 տեսակ [22], Լոռվա սարահարթի ջրաճահճային ֆլորայի կազմում հաշվում ենք 11 տեսակ: Իսկ Rosaceae ընտանիքի առավել բարձրադիր տեղ գրավելը ըստ Թախթաջյանի բնութագրական է ողջ Կովկասյան պրովինցիայի համար [16]: Այս հոլարկտիկական ընտանիքը [19] գրավում է նույնատիպ դիրք բազմաթիվ Բորեալ ֆլորաների սպեկտրում: Սովորաբար Հայաստանում այս ընտանիքը գրավում է բարձրադիր տեղ անտառային և հետանտառային ֆլորաների սպեկտրում [12, 20], որը պայմանավորված է ծառաթփային ներկայացուցիչների մեծ բազմազանությամբ: Սակայն մեր պարագայում ընտանիքի բոլոր ներկայացուցիչները խոտաբույսեր են՝ 5 ցեղերից (*Agrimonia, Alchemilla, Comarum, Filipendula, Potentilla*), և ընդգծում են հետազոտվող ֆլորայի ուրույն յուրահատկությունը [6]: Այս ընտանիքին են պատկանում միայն Լոռու ֆլորիստիկական շրջանից Բարսեղյանի կողմից հավաքված *Comarum palustre* L. տեսակը, որի հանդիպման հավանականությունը նշվում է նաև “Հայաստանի Ֆլորան” աշխատության համապատասխան հատորում (հատոր 3): Հինգերորդ տեղը գրավում է կոսմոպոլիտ Juncaceae ընտանիքը, որը առավել հարմարված է Երկիր մոլորակի բարեխառն ցուրտ շրջաններին, ներառյալ արևադարձային բարձրալեռները: Juncaceae ընտանիքի բազմաթիվ ներկայացուցիչներ նույնպես հարմարված են չափից ավելի խոնավ բնակատեղերին: Վեցերորդ տեղում Brassicaceae ընտանիքն է, որի հիմնական տեսակային բազմազանությունը հարմարված են Հին Միջերկրածովյան ավազանին: Մեր ֆլորայում ներկայացվում է 5 ցեղերով (սա բարձր ցուցանիշ է, որի շնորհիվ այս ընտանիքը կիսում է 3-4 տեղը Lamiaceae ընտանիքի հետ), սակայն ոչ շատ տեսակներով: Յոթերորդ տեղը զբաղեցնում է կոսմոպոլիտ Polygonaceae ընտանիքը, սակայն տեսակային առավել բազմազանությունը կենտրոնացված է Հյուսիսային կիսագնդի բարեխառն շրջաններում,

որոնք նախընտրում են հումիդային և հիդրոֆիտային բնակատեղեր: Ութերորդ և իններորդ տեղերը տեսակների հավասար թվաքանակով զբավում են Lamiaceae և Orchidaceae ընտանիքները: Lamiaceae ընտանիքում առավելապես միջերկրածովյան կամ հնագույն-միջերկրածովյան տարրեր են, որի ներկայացուցիչների մեծամասնությունը հարմարված են արիդային բնակատեղերին: Հետազոտվող ֆլորայի շրթնածաղկավորների տեսակները հիմնականում բորեալ տարրեր են: Orchidaceae ընտանիքը առանձնանում է իր բազմազանությամբ, հիմնականում Հին և Նոր Երկրի տրոպիկական շրջաններում: Բարեխառն շրջաններում առավելապես ներկայացվում է տեսակների լայն արեալներով: Ելնելով մեր ֆլորայի բնույթից, սպեկտրում այս ընտանիքի բարձր դիրքը արտասովոր չէ, չնայաց Հայաստանի այլ պարցիալ ֆլորաներում այն երբեք չի ընդգրկվում խոշոր ընտանիքների կազմի մեջ: Առաջատար ընտանիքների տասնյակը փակում է բազմառե-գիոնալ Asteraceae ընտանիքը, որը չնայած իր լայն տարածմանը և այն փաստին, որ բազմաթիվ ֆլորիստիկական շրջաններում զբավում է 1-5-րդ տեղերը, Լոռվա սարահարթի ջրաճահճային բուսականության ֆլորայի կազմում բավականին հետին տեղ է զբաղեցնում: Սա ևս կապված է մեր ֆլորայի բնակատեղերի առանձնահատկության հետ: Այնուհետև ցանկում ներառված են ընտա-նիքներ, որոնք ընդգրկում են 2-5 տեսակներ (48 տեսակ՝ 26.9 %), և 9 ընտանիքներ՝ մեկ ցեղի մեկ տեսակով (11.5 %): Լոռվա սարահարթի ջրաճահճային ֆլորայի առանձնահատուկ գծերը արտա-հայտվում են ցեղերի սպեկտրում (աղ. 3): 30 ցեղեր պարունակում են 2-3 տեսակներ (40 %), 39 ցեղեր՝ մեկական տեսակ (22 %): Արդյունքում խոշոր ցեղերին բաժին է ընկնում տեսակների 38 %-ը, որոնց ներկայացուցիչները նախընտրում են հիդրո- և հիգրոֆիլ բնակատեղեր: Բացառություն է կազմում *Galium* ցեղը, որի տեսակների համար առավել սովորական է հումիդային բնակատեղերը: Հետա-զոտվող ֆլորայի ցեղերի սպեկտրում առաջին տեղը զբաղեցնում է *Carex*-ը՝ 22 տեսակներով, որը առաջատար է հյուսիսային Հայաստանի բոլոր շրջանների համար [21]: Մեր ցանկում այն ընդգրկում է 2 տեսակներ, որոնք առկա են միայն Լոռու ֆլորիստիկական մարզում (*Carex appropinquata* Schum., *C. bohemica* Schreb.): Այս ցեղում գերակշռում է պալեարկտիկական բուսաշխարհագրական տիպը: Ուսումնասիրվող տարածքի ջրաճահճային ֆլորայի ցեղերի սպեկտրում երկրորդ տեղը զբաղեցնում է *Potamogeton* ցեղը 11 տեսակներով, որում գերակշռող է հոլարկտիկական բուսաշխարհագրական տիպը:

Աղ.3. Լոռվա սարահարթի ջրաճահճային ֆլորայի ցեղերի սպեկտրը

№	Ցեղ	Տեսակների քանակ	%
1	*Carex*	22	12.4
2	*Potamogeton*	11	6.2
3	*Juncus*	8	4.5
4	*Polygonum*	7	3.9
5-9	*Lemna*	4	2.2
5-9	*Orchis*	4	2.2
5-9	*Ranunculus*	4	2.2
5-9	*Galium*	4	2.2
5-9	*Sparganium*	4	2.2
	Ցեղեր, որոնք ներառում են 2-3 տեսակ	71	40
	Ցեղեր, որոնք ներառում են 1 տեսակ	39	22
	Ընդամենը	178	100

Երրորդ և չորրորդ տեղերը զբաղեցնում են *Juncus* և *Polygonum* ցեղերը: *Juncus* ցեղը ընդգրկում է տեսակների հավասար քանակով պալեարկտիկական և բազմառեգիոնալ բուսաշխարհագրական տիպեր և հոլարկտիկական բուսաշխարհագրական տիպի 2 տեսակ: Polygonum ցեղը ներառում է հոլարկտիկական և պալեարկտիկական բուսաշխարհագրական տիպերին պատկանող տեսակներ, և կովկասյան բուսաշխարհագրական տիպի մեկ տեսակ: *Lemna* ցեղը իր բազմառեգիոնալ բուսաշխարհագրական տիպին պատկանող տարրերով և *Orchis* ցեղը իր եվրո-միջերկրածովյան ու պալեարկտիկական տարրերով զբաղեցնում են հինգերորդ և վեցերորդ տեղերը ցեղերի սպեկտրում՝ տեսակների հավասար քանակով: Հաջորդ երեք ցեղերը նույնպես ունեն տեսակների այդ նույն թվաքանակը: Ընդ որում *Ranunculus* ցեղը, որը զբաղեցնում է յոթերորդ տեղը՝ չնայած տեսակների քիչ թվաքանակով, ներառում է պալեարկտիկական, եվրոմիջերկրածովյան և բազմառեգիոնալ բուսաշխարհագրական տիպերը: Իսկ ութերորդ և իններորդ տեղերում գտնվում են համապատասխանաբար *Galium* և *Sparganium* ցեղերը,

որոնցից վերջինս ներկայացվում է միատար բուսաշխարհագրական տիպով՝ հոլարկտիկական, իսկ *Galium* ցեղը բուսաշխարհագրական այդ տիպից բացի ընդգրկում է պալեարկտիկական մեկ տեսակ: Կարելի է եզրակացնել, որ հետազոտվող ֆլորան իր կարգաբանական կառուցվածքով կտրուկ առանձնանում է Հայաստանի այլ պարցիալ ֆլորաներից, որին կից Բորեալ ենթաթագավորության պարցիալ ֆլորաների համադրումը հաստատում է նրա ռելիկտային բնույթը: Հաշվի առնելով պարցիալ ֆլորայի մեծ ազդեցության տվյալները Լոռվա ֆլորիստիկական շրջանի ողջ ֆլորայի վրա, նրա կառուցվածքը հաստատում է, որ այն պատկանում է Կովկասի ֆլորիստիկական մարզի Բորեալ ենթաթագավորության Հոլարկտիկական թագավորությանը [13,16,21]: Լոռվա սարահարթի ջրաճահճային բուսականության ֆլորիստիկական կազմում գերակշռում են բուսաաշխարհագրական հյուսիսային (բորեալ) տարրերը:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. *Բալոյան Ս.Ա.* Հայաստանի ալպիական բուսական ծածկույթը, Երևան, 2005
2. Հայկական ՍՍՀ ֆիզիկական աշխարհագրություն, Երևան, 1971
3. *Մանասյան Մ.Գ., Գրիգորյան Ա.Թ., Եղյան Գ.Բ.* «Լոռու Մարզ», Երևան, 207 էջ, 2003
4. *Алексанян А.С.* Систематическая структура флоры аридных редколесий Южной Армении. Тахтаджяния. вып.1, Ереван, 163-168, 2011б.
5. *Асатрян А.Т.* Флора и растительность вулканического массива Араилер. Автореф. дисс. канд. биол. наук. Ереван, 25с, 1999.
6. *Барсегян А.М.* Водно-болотная флора Армении и ее анализ. Фл., растит. и раст. рес. Армянской ССР, *8*, 53-120, 1981.
7. *Гроссгейм А.А.* Флора Кавказа. Баку, М.-Л., 1-7, 1939-1967.
8. *Камелин Р.В.* Флорогенетический анализ естественной флоры горной Средней Азии. Л., 355 с, 1973.
9. Красная книга Армянской ССР: редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды растений (Сост. Э.Ц. Габриэлян и др.). Изд. “Айастан”, 270с, 1988.
10. Красная книга растений РА. Высшие растения и грибы. Второе издание. Ереван, 2010.
11. *Мкртчян С.С.* “Геология Армянской ССР”, Геоморфология, *1*, Ереван, 586 с, 1962.
12. *Сагателян А.А.* Флора и растительность Мегринского района Армянской ССР. Автореф. дисс. канд. биол. наук. Ереван, 24 с, 1983.
13. *Таманян К.Г., Файвуш Г.М.* К вопросу о флористическом районировании Армении, Флора, раст. и растит. ресурсы Армении. *17,* 73-78, 2010.
14. *Тахтаджян А.Л.* К познанию водной растительности Лорийской нагорной равнины . Тр. Биол. ин-та Арм. Фил. АН СССР, *1*, 19-37, 1939.
15. *Тахтаджян А.Л.* Флора Армении, 1. Ереван, 290 с, 1954.
16. *Тахтаджян А.Л.* Флористические области земли. Л. 247 с, 1978.
17. *Толмачев А.И.* К методике сравнительно-флористических исследований, Журн. Русск. бот. общ., *16*, 1, с. 111-124, 1931.
18. *Толмачев А.И.* О количественной характеристике флор и флористических областей, М.-Л., 37 с, 1941.
19. *Толмачев А.И.* Введение в географию растений, Л., 244 с, 1974.
20. *Файвуш Г.М.* Флора и растительность Ширака (Армянской ССР): Автореф. дисс. канд. биол. Наук. Ереван, 24с, 1983.
21. *Файвуш Г.М.* Анализ спектров семейств и родов флористических районов Армении. Бот. журн., *72,* 12, 1595-1604, 1987.
22. Флора Армении, Ереван, 1-11, 1954-2010.
23. *Ханджян Н.С.* Конспект флоры бассейна реки Мармарик (Армянская ССР), Фл., растит., раст. ресурсы Армении, вып. 9, с. 62 - 81, 1985.
24. *Ханджян Н.С., Туманян А.А.* Конспект водно-болотной флоры озер Лорийского плоскогорья (Армения). Тахтаджяния, Ереван, с. 178-180, 2011.
25. *Юрцев Б.А.* Очерк системы основных понятий флористики, в кн. Теоретические и методические проблемы сравнительной флористики, Л., с. 242-266, 1987а.
26. *Юрцев Б.А.* Флора как базовое понятие флористики: содержание, понятия, подходы к изучению. Сб. Теорет. и методические. проблемы сравнит. флористики. Л., с. 13-28, 1987б.

Ստացվել է 03.05.2013

Հայաստանի Գիտությունների Ազգային Ակադեմիա
Национальная Академия Наук Армении
National Academy of Sciences of Armenia

Հայաստանի Կենսաբանական Հանդես
Биологический Журнал Армении
Biological Journal of Armenia

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

Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 3(65), 2013

ԿՈՄՊՈՍՏԻՑ ՄԵԿՈՒՍԱՑՎԱԾ ԲԱԿՏԵՐԻՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ *AGARICUS BISPORUS* ԱՃԻ ՎՐԱ ԼԱԲՈՐԱՏՈՐ ԵՎ ՓՈՐՁԱՐՏԱԴՐԱԿԱՆ ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ

Ա.Գ. ՀԱԿՈԲՅԱՆ, Հ.Գ. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ

ՀՀԳԱԱ "Հայկենսատեխնոլոգիա" ԳԱԿ
hhov@sci.am

Ուսումնասիրվել է սնկի կոմպոստից անջատված և միջատապաթոգեն բակտերիաների ազդեցությունը *Agaricus bisporus*-ի աճի և որակի վրա: Ապացուցվել է, որ կոմպոստից անջատված բակտերիաների ներմուծումը ծածկող շերտ սնկերի աճի ընթացքում բերում է բերքատվության զգալի բարձրացման: Մյուս կողմից *Bacillus thuringiensis* տեսակին պատկանող միջատապաթոգեն բակտերիաների սփռումը կոմպոստի մակերեսին կտրուկ նվազեցնում է պտղամարմինների վնասվածությունը:

Agaricus bisporus – կոմպոստային միկրոօրգանիզմներ – սիներգիզմ

Изучено влияние выделенных из компоста и энтомопатогенных бактерий на рост и качество гриба *Agaricus bisporus*. Доказано, что внесение бактерий, выделенных из компоста в процессе роста грибов в покровный слой, приводит к повышению их урожайности. Но с другой стороны, опрыскивание поверхности компоста энтомопатогенными бактериями вида *Bacillus thuringiensis* резко снижает повреждаемость плодовых тел.

Agaricus bisporus – компостныя микроорганизмы – синергизм

The impact on growth and quality of *Agaricus bisporus* of isolated from compost and entomopathogenic bacteria is studied. The introduction of isolated from compost bacteria into the coating cover enhances the mushrum harvest. On the other hand, entomopathogen bacteria belonging to *Bacillus thuringiensis* species spreading on compost surface decrases of damages of frut bodies.

Agaricus bisporus – compostal microorganisms – synergism

Կոմպոստացումն ինքնաբերաբար ընթացող մանրէաբանական ֆերմենտացիայի ձև է: Միկրոօրգանիզմները (բակտերիաներ, ցածրակարգ սնկեր), որոնք մասնակցում են այդ պրոցեսին, լայնորեն տարածված են բնության մեջ, բավականին մեծ քանակությամբ պարունակվում են նաև կոմպոստի բաղադրիչներում՝ գոմաղբում և բուսական մնացորդներում: Բարենպաստ պայմաններում այդ միկրոօրգանիզմները արագորեն զարգանում են [3, 4]: Կոմպոստի միկրոօրգանիզմների ուսումնասիրությունը ցույց է տվել, որ դրանց 87%-ը պատկանում են *Bacillus* ցեղին, ընդունակ են զարգանալ 65^{0}C-ի պայմաններում [7]: Դրանցից առավել հաճախ հանդիպում է *B. stearothermophilus* տեսակը [12]: Կոմպոստացումը ուղղեկցվում է ջերմաստիճանի բարձրացմամբ (50-60^{0}C), որը բերում է մեզոֆիլ օրգանիզմների քանակի կտրուկ անկման և ջերմասեր միկրոօրգանիզմների աճի խթանման:

Կոմպոստավորման վերջնական նպատակն է ստեղծել սելեկտիվ սուբստրատ, նպաստավոր սնկի միցելիումի և օգտակար միկրոօրգանիզմների զարգացման համար [4,14]: Միկրոօրգանիզմները կարևոր դեր են խաղում ինչպես կոմպոստացման գործընթացում, այնպես էլ միցելիումի կուլտիվացման և *Agaricus bisporus*-ի պտղամարմնի

գոյացման ժամանակ: Ցույց է տրվել, որ *A. bisporus*-ը ստերիլ պայմաններում ընդհանրապես չի պտղաբերում: Պտղամարմնի ձևավորման հարցում մեծ դեր են խաղում միկրոօրգանիզմների կողմից կատարվող պրոցեսները, որոնք ընթանում են կոմպոստը ծածկող հողային շերտում: *A.bisporus*-ի պտղաբերման պրոցեսում հողային միկրոօրգանիզմների խթանող ազդեցություններից կարելի է նշել հետևյալները՝ ա) *A. bisporus*-ի աճը ճնշվում է միկրոօրգանիզմների կողմից, որի արդյունքում ձևավորվում է պտղամարմինը [13], բ) միցելիումի աճը և պտղաբերումը խթանվում է միկրոօրգանիզմների կողմից [9], գ) միկրոօրգանիզմները առաջացնում են նյութեր, որոնք խթանում են պտղաբերումը [10], դ) միկրոօրգանիզմները կլանում են *A. bisporus*-ի կողմից անջատված ավտոինհիբիտորները [10,15], իսկ բակտերիաները այդ դեպքում նպաստում են երկաթի իոնների ազատմանը, որն անհրաժեշտ է պտղաբերման համար [11]:

Աշխատանքի նպատակն է եղել ուսումնասիրել կոմպոստի նմուշներից մեր կողմից անջատված սպորավոր բակտերիաների որոշ տեսակների ազդեցությունը *A. bisporus*-ի վրա լաբորատոր և փորձնական արտադրության պայմաններում:

Նյութ և մեթոդ: *Bacillus sphaericus* AH9, *B. sphaericus* AH11, *B. megaterium* AH102, *B. stearothermophilus* AH122 անջատվել է կոմպոստից. *B. sp.* WS1 – անջատվել է շամպինյոնի ցորենային վարակված ցանքսանյութից: *B. thuringiensis subsp. israilensis INMIA2477, B. thuringiensis subsp. Israilensis INMIA1125, B. sphaericus ИНМИА2633* և *Pseudomonas sp.* ոչ սպորավոր կուլտուրա ստացվել են ՀՀ ԳԱԱ ,Հայկենսատեխնոլոգիաե ԳԱԿ-ի Մանրէների ավանդադրման կենտրոնից (ՄԱԿ): Ուտելի սնկերի *A. bisporus 20* և *A. bisporus 3712* շտամները (և ՄԱԿ-ից): Պինդ քաղցու` քաղցու ածիկ (շաքարայնությունը 7^0) – 1000 մլ, դիֆկո ագար – 20,0 գ, pH 6,0-6,5. Տրիպտոզ ագար Ferak Berlin.

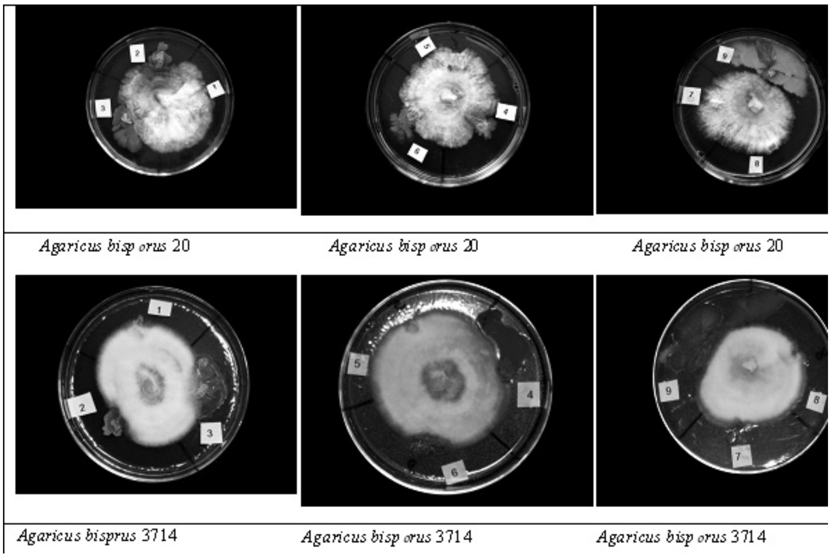
Ցանքսանյութի պատրաստման համար ցորենի հատիկները լվացվում է հոսող ջրի տակ, 10 կգ ցորենին ավելացվում է 15 լ ջուր, եռացվում 15-20 րոպե թույլ կրակի վրա: Եփված ցորենը քամվում և մոտ 20 րոպե չորացվում է օդափոխվող սենյակում, այնուհետև pH-ի կարգավորման նպատակով ավելացվում է 120 գ կիր, 30 գ կավիճ և լավ խառնվում: Հետո ցորենը (մոտ 350-400 գ) 2/3 ծավալով լցվում է 1լ-ոց ապակյա տարաների մեջ, փակվում բամբակե խցանով և ստերիլիզացվում է ավտոկլավում 121^0C տակ 1,5 ժ: Սուբստրատը ավտոկլավից հանելուց հետո սառեցվում է մինչև $24-26^0C$ ու ինոկուլյացվում սրվակում թեք ագարի վրա աճեցված միցելիումով: Հետագա ինկուբացումը կատարվում է թերմոստատում $24-26^0C$-ում 3-4 շաբաթ: Ցորենի հատիկների սոսնձումը կասեցնելու և միցելիումի աճը խթանելու նպատակով տարաների պարունակությունը շաբաթը մեկ լավ խառնվում է: Աճած միցելիումը պահվում է սառնարանում $2-4^0C$-ում:

Բազիդոմիցետների աճեցումը փորձաարտադրական պայմաններում տարվել է հետևյալ կերպ` կոմպոստի և ցորենի հատիկի վրա աճեցված բազիդիոմիցետների միցելիումի համասեռ խառնուրդը լցվել է 10 կգ պարկերի մեջ և տեղադրվել սնկանոցում 24´C-ում [2, 4]:

Կոմպոստը պատրաստվել է ցորենի ծղոտից և ոչխարի գոմաղբից 1:1 հարաբերությամբ, հետևյալ հավելումներով (կգ/տ)` գիպս – 62, գաջ – 62, սելիտրա – 37, սուպերֆոսֆատ – 25, կարբամիդ – 1, մինչև 80% խոնավությամբ: Ծղոտին թրջումից 5 օր անց խառնվում է գոմաղբը, հավելումները և ձևավորվում է բուրտը (1.8 մ x 1.8 մ x 1.8 մ), որը պարբերաբար խառնվում է: Մոտ մեկ ամիս հետո հասունացված կոմպոստը պաստերիզացվում է 60´C-ում 36 ժ ընթացքում, այնուհետև լցվում է պոլիէթիլենային պարկերի մեջ 30-40 սմ հաստությամբ:

Արդյունքներ և քննարկում: Ստուգվել է կոմպոստից անջատված սպորավոր բակտերիաների աճի ազդեցությունը սնկերի վրա Պետրիի թասիկներում: Ագարիզացված սննդամիջավայրի կենտրոնում տեղադրվել է սնկի միցելիումը ագարից կտրված խորանարդիկի ձևով, 7 օր աճից հետո թասիկների պարագծով հավասար հեռավորության վրա տեղադրվել են թեստ բակտերիաների ագարային գազոններից կտրված խորանարդիկները և համատեղ աճեցվել 26´C պայմաններում ևս 7 օր: Սնկերի և բակտերիաների փոխազդեցության պատկերը ներկայացված է նկ. 1-ում:

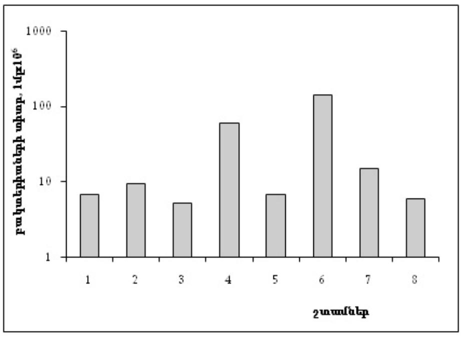
Ինչպես երևում է նկ.1-ից, կոմպոստից անջատված AH9(5), AH11(7), AH122(8) կուլտուրաները, ինչպես նաև *B.sphaericus* 2633(1), բացառությամբ AH-102(6), սնկերի հետ գտնվում են համակեցության վիճակում, չցուցաբերելով անտագոնիզմ: *B. megaterium* տեսակին պատկանող AH102 շտամը (6), *B. thuringiensis* 1125(2), *B. thuringiensis* 2477(3), և *Pseudomonas* sp. (4) շտամները ճնշում են ստուգված երկու սնկային կուլտուրաների աճը: Սնկերի հանդեպ առավել ցայտուն անտագոնիզմ է դրսևորում *Bacillus* sp. WS1(9) շտամը, որի շուրջ աճի ճնշման գոտու առկայությունը վկայում է նրա կողմից հակասնկային միացությունների ակտիվ սինթեզի մասին:



Նկ. 1. Կոմպոստից անջատված սպորավոր բակտերիաների փոխազդեցությունը *A. bispoprus*-ի *3714* և *20* շտամների հետ ագարային միջավայրում:
1 – B.sphaericus 2633, 2 – B. thuringiensis 1125, 3 – B. thuringiensis 2477,
4 – Pseudomonas sp., 5 B.sphaericus – AH9, 6 – B.megaterium – AH-102,
7 – B.sphaericus -AH11, 8 – B. stearothermophilus – AH122, 9 – Bacillus sp. WS1 շտամները:

Բարձրակարգ ուտելի սնկերի կենսունակությունը մեծապես կախված է բիոտիկ գործոններից, որոնք սուբստրատում առաջանում են այնտեղ առկա միկրոօրգանիզմների կենսագործունեության արդյունքում [8]: Սնկերի աճի և որակի վրա կարող են ազդել նաև միջատները (*Sciaridae, Phoridae, Cecidomyiidae*), որոնք հանդիսանում են այնպիսի հիվանդությունների փոխադրիչներ, ինչպիսիք են չոր և թաց փտումը, սարդոստայնակերպ բորբոսը, տրիխոդերման: Դրանցից մի քանիսը, օրինակ, սցիարիդների թրթուրները, նեմատոդները, վնասելով պրիմորձիները կանխարգելում են պտղամարմինների առաջացումը [1, 5]:

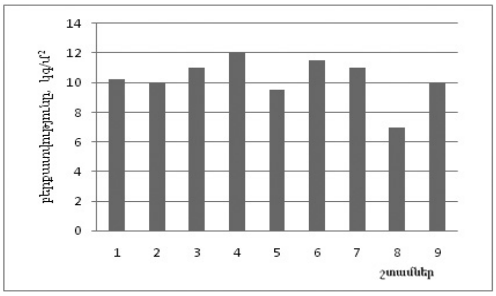
Քանի որ սնկերը աճեցվում են 24-26^{0}C-ում, նախքան բակտերիաների ազդեցության որոշումը նրանց աճի և պտղաբերության վրա ուսումնասիրվել է փորձարկման համար նախատեսված բակտերիաների աճի պոտենցիալը նշված ջերմաստիճանի տակ: Թեք ագարի վրա աճած կուլտուրաները լվացվել են ծորակի ստերիլ ջրով և որոշվել է նրանցում բջիջների տիտրը մանրադիտակի տակ՝ ըստ Գորյաևի (նկ. 2):



Նկ. 2. Բակտերիալ բջիջների քանակը 1 մլ կախույթում 26^{0}C-ում աճի տակ
1 – B.sphaericus 2633, *2 – B. thuringiensis 1125, 3 – B. thuringiensis 2477,*
4 – B.sphaericus – AH9, 5 – B.megaterium –AH-102, 6 – B.sphaericus –AH11,
7 – B.stearothermophilus –AH122, 8 – Bacillus sp. WS1

Ինչպես երևում է նկ.1-ից, կոմպոստից անջատված *B.sphaericus AH9* և *B.sphaericus* AH11 կուլտուրաները նշված ջերմաստիճանի պայմաններում ցուցաբերում են առավել աճի ընդունակություն համեմատած մյուս կուլտուրաների:

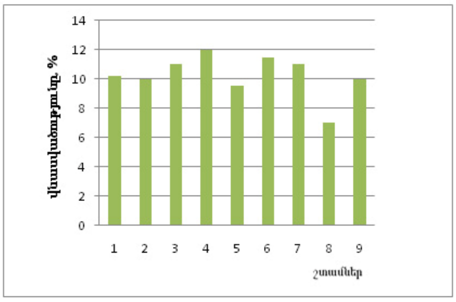
Ուսումնասիրվել է կոմպոստից անջատված բակտերիաների ազդեցությունը սնկերի աճի վրա փորձաարտադրական պայմաններում: Որպես ստուգիչ օգտագործվել են հայտնի միջատասպան *B.sphaericus 2633*, *B.thuringiensis 1125*, *B.thuringiensis* 2477 կուլտուրաները: Բակտերիալ սուսպենզիաները 9 մլ. յուրաքանչյուրը պուլվելիզատորի միջոցով սփռվել է պարկի մակերեսին 1-ին և 14-րդ օրը 60-70 % միցելիումի աճի առկայության դեպքում, երբ միջատները գտնվում են զարգացման թրթուրային փուլում: Այնուհետև երկու օր անց պարկերը ծածկվել են հողի բարակ շերտով: Բակտերիաների երրորդ ներմուծումը կատարվել է ինկուբացիայի 21-րդ օրը, երբ սնկային միցելիումը ներաճած է լինում հողի ծածկող շերտում: Փորձնական պարկերի սնկերի բերքատվությունը համեմատվել է ստուգիչ պարկի հետ (նկ. 3):



Նկ. 3. *Agaricus bisporus 3712 և 20* շտամների միջին բերքատվությունը, կգ/մ^2
1-B.sphaericus 2633, 2 - B. thuringiensis 1125, 3 - B. thuringiensis 2477,
4 B.sphaericus - AH9, 5 B.megaterium AH-102, 6- B. sphaericus -AH11,
7-B.stearothermophilus AH122, 8-Bacillus sp. WS1, 9- Ստուգիչ

Ինչպես երևում է ներկայացված հիստոգրամից, սնկերի աճի վրա դրական ազդեցություն են գործել կոմպոստից անջատված *B. sphaericus* – AH9, *B. sphaericus* – AH11 և *B. stearothermophilus* – AH122 կուլտուրաները, բարձրացնելով բերքատվությունը 10-20 %-ով: Մյուս կուլտուրաները, բացի *B. sp.* WS1-ից, ընդհանուր առմամբ չեն ազդել սնկային միցելիումի աճի և պտղամարմինների ձևավորման վրա: Պարկերը, որոնցում միցելիումը վարակված է *B. sp.* WS1-կուլտուրայի սուսպենզիայով, ձևավորել են մեծ քանակությամբ պրիմորձիներ, որոնք հետագայում չեն հասունացել:

Ի տարբերություն բերքատվության առողջ պտղամարմինների առաջացման վրա դրական ազդեցությամբ են օժտված հայտնի միջատասպան *B. thuringiensis* կուլտուրաները, որոնք իջեցրել են վնասվածությունը 3-4 անգամ: Համաձայն մեր դիտարկումներին, պարկերը, որոնք վարակված են եղել *B. thuringiensis* – 2477, *B. thuringiensis* – 1125 և *B. sphaericus* – 2633 բակտերիաների սուսպենզիաներով, թրթուրներ և մլակներ չեն զարգացել: Այն դեպքում երբ կոմպոստից անջատված *B. sphaericus* շտամները համեմատաբար թույլ են ազդում միջատների զարգացման վրա (նկ. 4):



Նկ. 4. Պտղամարմինների վնասվածությունը, %
1-*B.sphaericus* 2633, 2-*B. thuringiensis* 1125, 3-*B. thuringiensis* 2477,
4-*B.sphaericus* AH9, 5-*B.megaterium* AH102, 6-*B. sphaericus* AH11,
7-*B.stearothermophilus* AH122, 8-*Bacillus sp.* WS1, 9-Ստուգիչ

Անհրաժեշտ է նշել, որ միջատասպան բակտերիաները հանդես չեն գալիս որպես անտագոնիստներ բարձրակարգ սնկերի նկատմամբ և չեն ազդում պտղամարմինների որակի և արտաքին տեսքի վրա: Պարզվեց, որ բակտերիաների ներմուծումը կոմպոստ չի ուղեկցվում ջերմաստիճանի բարձրացմամբ, ինչը վկայում է ցածր մետաբոլիկ ակտիվության մասին: Նկատված երևույթը կարելի է բացատրել կոմպոստացման ընթացքում բակտերիաներին հասանելի սննդանյութերի սպառմամբ: Հայտնաբերված դրական ազդեցությունը սնկերի աճի և որակի վրա հավանաբար արդյունք է երկրորդային մետաբոլիտների սինթեզի, ինչպիսիք են հակաօքսիդանտները և միջատասպան բյուրեղները:

Այսպիսով կարելի է եզրակացնել, որ բարձրակարգ սնկերի աճեցման ժամանակ նպատակահարմար է *B. thuringiensis* և մեր կողմից կոմպոստից անջատված *B. Sphaericus* բակտերիաները համատեղ օգտագործումը՝ առաջինները միջատների դեմ, իսկ վերջինները՝ որպես սնկի աճի խթանիչներ:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. *Мокроусова Е.П., Селиванова О.К., Холодов Г.А.* Фауна членистоногих на шампиньонницах Ленинградской области. Школа грибоводства. *1*, 31, с.10, 2005.
2. *Морозов А. И.* Промышленное производство шампиньонов. М., ООО, Изд-во АСТ, Донецк, Сталкер, 173с, 2004.
3. *Ранчева Ц.* Производство на гъба печурки. София, Земиздат. б., 200с., 1965,
4. *Ранчева Ц.* Интенсивное производство шампиньонов.М.: Агропромиздат, с. 22, 23, 27-29, 107-109. 1990.
5. *Сафрай А.И.* Средства защиты культуры шампиньона от вредителей. Школа грибоводства. *41*, с. 8, 2006.
6. *Смирнов Ф.Г.* Сухая гниль или вертициллез. Школа грибоводства. *1,* 31, с.21, 2005.
7. *Bitton, Gabriel,* Wastewater Microbiology. p. 212. Wiley-Liss, Inc. 605 Third Avenue, New York, NY 10518-0012, 1994.
8. *Chang Shu-Ting, Miles P.G.* Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact. CRC Pressp. 159-185, 2004.
9. *Curto S., Favelli F.* Stimulative effect of certain microorganisms (bacteria, yeasts, microalgae) upon fruitbody formation of *Agaricus bisporus* (Lange) Sing. In: Mushroom Science. VIII, London, p.67-74, 1972.
10. *Eger G.* Experiments and comment on the action of bacteria on sporophore initiation in *Agaricus bisporus*. In: Mushroom Science ,VIII, London, p.719-725, 1972.
11. *Hayes W.A.* Nitritional factors in relation to mushroom production. In: Mushroom Science. VIII, London, p. 663-674, 1972.
12. *Heltay I.* Report of the situation and problems of Hungarian mushroom-research and experimental work. Mushrom Sci.3, p.120-124 1956.
13. *Peerally A.* Sporophore initiation in *Agaricus bisporus* and *Agaricus bitorquis* in relation to bacteria and activated charcoal. In: Mushroom Science X. Bordeaux, 1, p. 611-639, 1979.
14. *Wood D.A. Fermor J.R.* Nutrition of *Agaricus bisporus* in compost In: Mushroom Science XI. Sydney, 2, 63-71, 1981.
15. *Wood D.A.* Primordium formation in axenic cultures of *Agaricus bisporus* (Lange) Sing.J. Gen. Microbiol., 2, 313-323,1976.

Ստացվել է 17.12.2012

Հայաստանի Գիտությունների Ազգային Ակադեմիա
Национальная Академия Наук Армении
National Academy of Sciences of Armenia

Հայաստանի Կենսաբանական Հանդես
Биологический Журнал Армении
Biological Journal of Armenia

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

Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 3(65), 2013

ԷԿՈԼՈԳԻԱԿԱՆ ԳՈՐԾՈՆՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԺԱՅՌԱՅԻՆ ՄՈՂԵՍՆԵՐԻ ՄԱԿԱԲՈՒԾԱՅԻՆ ՎԱՐԱԿՎԱԾՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Թ.Կ. ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ, Ռ.Կ. ՊԵՏՐՈՍՅԱՆ, Ֆ.Դ. ԴԱՆԻԵԼՅԱՆ, Մ.Ս. ԱՌԱՔԵԼՅԱՆ

Երևանի պետական համալսարան, կենդանաբանության ամբիոն
temharutunyan@gmail.com

Համեմատվել են Երևանի Հրազդանի կիրճի *Darevskia nairensis* և Գեղարդի տարածքի *D. raddei*-ի ժայռային մողեսների պոպուլյացիաները: Նկարագրվել է արյան մակաբույծերով և էկտոմակաբույծներով վարակվածությունը՝ ելնելով սեզոնային և տարածքային առանձնահատկություններից:

Ժայռային մողեսներ – արյան մակաբույծներ – էկտոմակաբույծներ

Сравнивались популяции скальных ящериц *Darevskia nairensis* из территории Еревана (ущелье Раздан) и *D. raddei* из территории Гегарда. Описана зараженность экто- и кровепаразитами в зависимости от сезонных и региональных особенностей.

Скальные ящерицы – кровепаразиты – эктопаразиты

Two populations of *Darevskia nairensis* from Yerevan (Hrazdan canyon) and of *D. raddei* from Geghard are compared. The infection of blood parasites and by ectoparasites was described depending on seasonal and territorial characteristics.

Rock lizards – blood parasites – ectoparasites

Հայաստանում բնակվող *Darevskia* ցեղի ժայռային մողեսները հանդիսանում են հետաքրքիր և ուսումնասիրությունների համար խիստ բազմազան հատկություններով օժտված օբյեկտներ [13]: Մեր երկրի տարածքում այս մողեսները ներկայացված են 4 կուսածին (*D. armeniaca, D. unisexualis, D. rostombekovi, D. dahli*) և 4 երկսեռ (*D. raddei, D. portschinskii, D. valentini, D. nairensis*) տեսակներով, որոնք լայնորեն տարածված են երկրի ողջ տարածքում, զբաղեցնում են ամենատարբեր կենսախորշեր, առաջացնում սիմպատրիկ պոպուլյացիաներ և տարբեր հիբրիդներ, որը մեզ տալիս է այս կենդանիների ուսումնասիրման անսահմանափակ հնարավորություն:

Ժայռային մողեսների արյան մակաբույծներով և էկտոմակաբույծներով վարակվածության ուսումնասիրությունը հնարավորություն է տալիս տարբեր համեմատություններ կատարել, ելնելով նրանց մակաբուծային ընկալունակությունից: Հայտնի է, որ բացի մի շարք կենսական գործոններից, մակաբուծային վարակվածության վրա ազդում են նաև ոչ կենսական բազմաթիվ գործոններ, ջերմաստիճանը, խոնավությունը, լանդշաֆտը և այլն [8, 9, 14, 15]:

Վերջին ժամանակներս գիտության տարբեր բնագավառներում խիստ կարևորվում է էկոլոգիական ուղղվածությունը և այդ թվում շրջակա միջավայրի ազդեցությունը մակաբուծաֆաունայի ձևավորման վրա: Այսինքն, տարբեր կենսական և ոչ կենսական գործոնների ազդեցությունը տիրոջ մակաբույծներով վարակվածության աստիճանի և տեր-մակաբույծ համակարգի ամենատարբեր բնագավառների վրա: Նման աշխատանքներ տարբեր խմբերի մակաբույծների վրա կատարվել են Դոգելի [4], մի շարք հետազոտողների կողմից [4, 7, 12]: Սակայն եթե նման աշխատանք- ները վերաբերում են կարգաբանական տարբեր խմբերի պատկանող մակաբույծների, ապա արյան մակաբույծների վերաբերյալ աշխատանքները չափազանց թերի են [6, 10]:

Ինչ վերաբերում է սողունների, հատկապես ժայռային մողեսների արյան մակաբույծներով վարակածության կախվածությանը շրջակա միջավայրի պայմաններից, ապա նման աշխատանքներ գրականության մեջ գործնականում բացակայում են:

Այս աշխատանքում փորձում ենք պարզաբանել մակաբույծ-տեր փոխհարաբերությունները և 2 տեսակ ժայռային մողեսների (*D. nairensis* և *D. raddei*) մակաբույծներով վարակածության աստիճանը՝ կախված նրանց բնակության վայրից և սեզոնից:

Նյութ և մեթոդ: Աշխատանքի համար որպես նյութ են օգտագործվել 2011 թ. մայիս-հուլիս հավաքված ժայռային մողեսները: Հավաքը կատարվել է Երևանի Հրազդանի կիրճի (որտեղ հանդիպում է *D.nairensis* տեսակը) և Գեղարդի տարածքներից (որտեղ հանդիպում է *D. raddei*-ի տեսակը): Մայիս-հուլիս ամիսների ընթացքում յուրաքանչյուր պոպուլյացիայից կատարվել է 3-ական հավաք: Բռնվել են *D.nairensis*-ի 33 (17 էգ և 16 արու)՝ յուրաքանչյուր հավաքից 11 և *D. raddei* 30 առանձնյակ (15 արու և 15 էգ)՝ յուրաքանչյուր հավաքից 10-ական սեռահասուն առանձնյակ:

Կենդանիները համարակալվել են, նշվել է սեռը, չափվել է մարմնի ընդհանուր երկարությունը: Քսուքի համար անհրաժեշտ արյունը վերցվել է պոչից [17]: Արյունը կաթեցրել ենք առարկայակիր ապակու վրա և մեկ այլ ապակիով տարածել: Արյան և լյարդի վարակվածության համեմատության համար յուրաքանչյուր մողեսի լյարդից ստացել ենք պատրաստուկներ, որոնք համարակալվել են կենդանու արյան քսուքին համապատասխան: Ստացված քսուքները և լյարդի պատրաստուկները չորացվել են, ֆիքսվել մեթանոլով, որից հետո ներկվել Գիմզա-Ռոմանովսկու մեթոդով: Ներկված քսուքները դիտել ենք մանրադիտակի տակ՝ x 400 խոշորացմամբ: Յուրաքանչյուր քսուքում պատահական ընտրված դաշտերում հաշվել ենք 2000 էրիթրոցիտ և դրանցում եղած վարակված էրիթրոցիտների քանակը: Արյան բոլոր մակաբույծները, ըստ ձևաբանական տարբերությունների բաշխվել են վեց ձևի [1, 2, 5, 11], որոնցից 1-ին, 2-րդ և 6-րդ ձևերը պատկանում են *Hepatozoon sp.*-ին, իսկ 2-րդ, 3-րդ և 4-րդ ձևերը՝ *Karyolysus sp.*-ին: Կատարվել է նաև էկտոմակաբույծների՝ մողեսների տզերի (*Sauronyssus saurarum*) հավաք (ընտանիք գամազայիններ): Հավաքված բոլոր առանձնյակները գտնվել են պրոտոնիմֆայի փուլում [3]:

Արդյունքներ և քննարկում: Հավաքված *D. nairensis*-ի Հրազդանի կիրճից որսված 34 առանձնյակի վարակվածությունը ընթանում է տարբեր կերպ (աղ.1).

Աղ.1. *D. nairensis* տեսակի վարակվածության էքստենսիվությունն ու ինտենսիվությունը

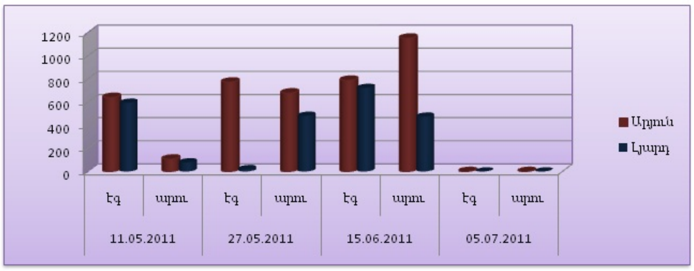
Տարեթիվ	Քանակ (արու/էգ)	Վարակված առանձնյակների քանակը (արու/էգ)	Վարակման էքստենսիվությունը (արու/էգ)	Վարակման ինտենսիվությունը (արու/էգ)
11.05.2011	10 (5/5)	7 (4/3)	70% (40/30%)	138.1 (36.6/27.4)
27.05.2011	6 (5/1)	6 (5/1)	60% (50/10%)	147.8 (167.6/22)
15.06.2011	10 (5/5)	8 (3/5)	80% (30/50%)	152.5 (33.4/271.6)
05.07.2011	8 (2/6)	0	0	0

D. nairensis տեսակի երեք ամիսների ընթացքում հավաքված մողեսների վարակման էքստենսիվությունը կազմում է 38.23% (արու – 29.4%, էգ – 47.06%), ինտենսիվությունը՝ 112.3 (արու 73.35, էգ 151.6): *D. nairensis*-ի տեսակին պատկանող մողեսների վարակման ընթացքի փոփոխությունը երեք ամիսների ընթացքում արտահայտվում է հետևյալ կերպ (նկ.1).

Նկ.1. Վարակման ընթացքի փոփոխությունն ըստ սեզոնի

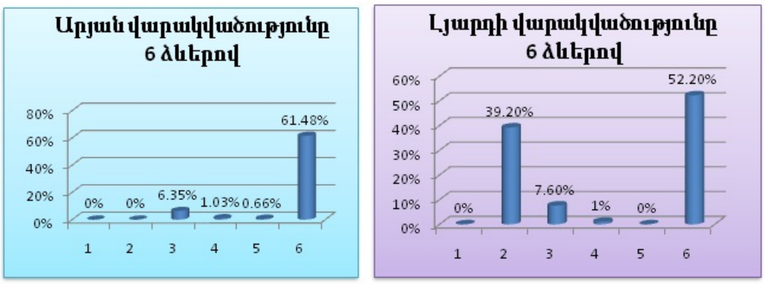
Ինչպես երևում է նկ.1-ից, մողեսների առաջին հավաքի ժամանակ վարակվածությունը եղել է բավականին բարձր ինչպես արյան, այնպես էլ լյարդի քսուքներում: Հաջորդ՝ մայիսի վերջին կատարված հավաքի արդյունքները ցույց են տալիս վարակվածության զգալի նվազում:

Վարակվածության ամենաբարձր աստիճանը դիտվել է հունիսի 15-ին հավաք-ված առանձնյակների փորձանմուշներում, իսկ արդեն վերջին հավաքի ժամանակ հավաքված առաձնյակների քուսքներում առհասարակ վարակվածություն չի գրանցվել (նկ.2):



Նկ.2. *D. nairensis* տեսակի էգերի և արուների վարակվածության համեմատությունը

Էգերի և արուների համեմատությունից երևում է, որ տարբեր ժամանակաշրջան-ներում շատ ավելի վարակված են եղել էգերը: Դա առավել արտահայտված է մայիսի սկզբի և հունիսի հավաքների ժամանակ, մայիսի վերջին էգերի և արուների միջև տարբերությունը կրճատվում է, իսկ արդեն հուլիսին երկուսի մոտ էլ դիտվում է վարակվածության մարում: Մակաբույծների 6 ձևերի համեմատությունը տալիս է հետևյալ արդյունքը (նկ. 3, 4).



Նկ. 3, 4. *D. nairensis* - ի արյան և լյարդի քուսքների վարակվածությունը վեց ձևերով

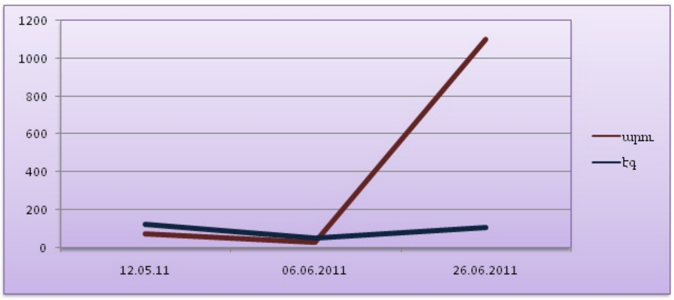
Արյան քուսքներում վարակվածություն չի դիտվել 1-ին և 2-րդ, իսկ լյարդում՝ 1-ին և 5-րդ ձևերով: 3-րդ, 4-րդ և 6-րդ ձևերով վարակվածությունը գրեթե նույնն է: Սակայն լյարդի քսուքում դիտվում է վարակվածություն 4-րդ ձևով: Դա կարելի է բացատրել նրանով, որ սա իրենից ներկայացնում է սպորավորների զարգացման սկզբնական փուլ, հետևաբար, հանդիպման հաճախությունը լյարդի բջիջներում պետք է լինի առավել մեծ:

D. raddei-ի ուսումնասիրված 28 առանձնյակի մոտ՝ կախված սեռից նույնպես դիտվում են նկատելի փոփոխություններ (աղ.2).

Աղ.2. *D. raddei* տեսակի վարակվածության էքստենսիվությունն ու ինտենսիվությունը

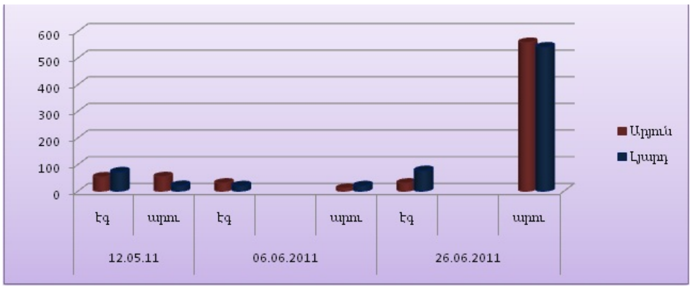
Տարեթիվ	Քանակ (արու/էգ)	Վարակված առանձնյակների քանակը (արու/էգ)	Վարակման էքստենսի վությունը (արու/էգ)	Վարակման ինտենսիվությունը (արու/էգ)
12.05.11	10 (5/5)	7 (4/3)	70% (70/30%)	20 (27.6/12.4)
06.06.2011	8 (4/4)	5 (2/3)	50% (20/30%)	10 (10/10)
26.06.2011	10 (6/4)	10 (6/4)	100% (60/40%)	116.6 (170.5/35.75)

D. raddei երեք ամիսների ընթացքում հավաքված մողեսների վարակման էքստենսիվությունը կազմում է 78,57 % (արու 80 %, էգ 76,92 %), ինտենսիվությունը՝ 51,57 (արու 79,87, էգ 18,85): Առաջին իսկ հայացքից պարզ է դառնում, որ *D. raddei*-ի վարակվածությունն անհամեմատ ավելի քիչ է, քան *D. nairensis*-ի մոտ: Ըստ սեռնի այս տեսակի վարակվածության փոփոխությունը երևում է գծապատկերի վրա (նկ.5).



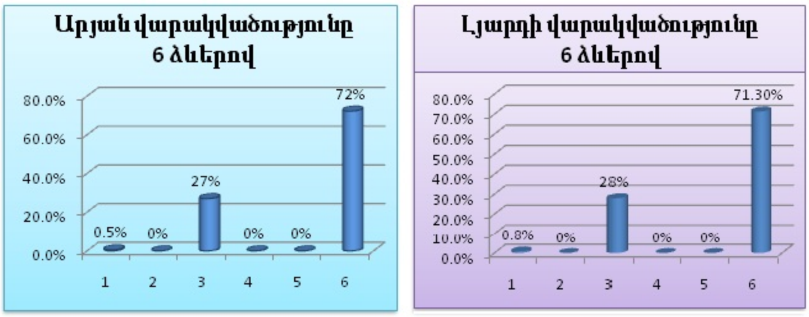
Նկ. 5. Վարակման ընթացքի փոփոխությունն ըստ սեռնի

D. nairensis մողեսների մոտ մայիսի սկզբի վառ արտահայտված վարակվածությունն այստեղ բացակայում է: Այդ ժամանակաշրջանում վարակվածությունը շատ փոքր է: Հունիսի սկզբին այն գրեթե մարում է և իր գագաթնակետին է հասնում հունիսի վերջին: *D. raddei* մողեսի արյան քսուքների և լյարդի պատրաստուկների արուների և էգերի համեմատությունը արտահայտվում է հետևյալ կերպ (նկ. 6).



Նկ. 6. *D. raddei* տեսակի էգերի և արուների վարակվածության համեմատությունը

Գրեթե բոլոր օրինակներում արուների և էգերի վարակվածությունն ընթանում է միանման, բացառություն են կազմում վերջին՝ հունիսի 26-ի հավաքի արդյունքները, որտեղ արուների վարակվածության աստիճանը զերազանցապես տարբերվում է էգերից: Վարակվածությունը լյարդի և ծայրամասային արյան քսուքներում ընթանում է միանման: Մակաբուծային 6 ձևերով վարակվածությունը նույնպես միանման չէ և խիստ տատանվում է ինչպես արյան, այնպես էլ լյարդի քսուքներում (նկ.7, 8):



Նկ. 7, 8. *D. raddei* - ի արյան և լյարդի քսուքների վարակվածությունը վեց ձևերով

Նկ. 7, 8-ից երևում է, որ արյան և լյարդի քսուքներում 2-րդ, 4-րդ և 5-րդ ձևով վարակվածություն չի դիտվել, իսկ մնացած ձևերով վարակվածությունն ընթացել է գրեթե միանման: Այսպես, ուսումնասիրված երկու տեսակներն իրարից տարբերվում են վարակվածության զարգացման ընթացքով, սակայն երկու տեսակների մոտ էլ 6-րդ ձևով խիստ վարակվածությունը կարող է կապված լինել տեսակային առանձնահատկությունների կամ զարգացման այս փուլի երկարատևության հետ:

Ըստ գրականության տվյալների, կենդանական տարբեր խմբերի մոտ մակաբույծներով վարակմանն ավելի հակված են արուները (կախված նրանց մեծ ակտիվության և անդրոգեն հորմոնի իմունոսուպրեսոր հատկությամբ), քան էգերը [16, 18]: Մեր աշխատանքում այս պնդումը հակասական է. *D. nairensis* տեսակի մոտ առավել վարակ-ված են էգերը, իսկ *D. raddei* տեսակի մոտ՝ արուները: Ընդհանուր առմամբ, *D. nairensis*-ի պոպուլյացիան անհամեմատ ավելի վարակված է, քան *D. raddei*-ինը: *D. nairensis*-ի առավելագույն վարակվածությունն ընկած է մայիսի վերջից հունիսի կեսեր, իսկ *D. raddei*-ի մոտ՝ հունիսի վերջ: Տվյալ շրջանը համընկնում է այս երկու տեսակի բեղմնավորման ժամկետների հետ: Այսինքն, այդ ժամանակաշրջանում երկու տեսակների արուների մոտ դիտվում է բարձր ակտիվություն՝ հակառակ սեռի առանձնյակ գտնելու նպատակով: Եթե փորձենք այդ հանգամանքով բացատրել *D. raddei*-ի արուների առավել մեծ վարակվածությունը, ապա կառաջանա հակասություն կապված *D. nairensis* տեսակի հետ, քանի որ նման ակտիվ ժամանակաշրջանում նրանց վարակվածությունը զգալի ցածր է:

Արյան և լյարդի համեմատությունը ցույց է տալիս, որ վարակվածությունը երկու դեպքում էլ ընթանում է միանման: Դա բացատրվում է արյան մակաբույծներին բնորոշ կենսաշրջանով, երբ տեղի է ունենում լյարդային շիզոգոնիա, որին հաջորդում է մերոզոիտների անցումը ծայրամասային արյուն: Էրիթրոցիտներում տեղի է ունենում էրիթրոցիտային շիզոգոնիա և հեմոգրեգարինների հետագա զարգացում:

Այսպիսով, երկու տեսակի ժայռային երկսեռ մողեսների վարակվածության նման տարբերությունները մնում է միայն կապել նրանց ապրելավայրի և վերջիններիս բնակլիմայական պայմանների հետ.

Երևանը գտնվում է ծովի մակերևույթից 900-1300 մ, իսկ Գեղարդը՝ 1450 մ բարձրության վրա: Երևանի կլիման չորային է, այդ ժամանակաշրջանում օդի միջին ջերմաստիճանը կարող է հասնել մինչև 30⁰C-ի, իսկ Գեղարդինը՝ 18⁰C: Երևանի համեմատ բարձր է Գեղարդի տեղումների քանակը և օդի հարաբերական խոնավությունը: Երևանի լանդշաֆտը չոր կիսաանապատային է, Գեղարդինը՝ խոնավ տափաստանային: Այսինքն, այս դեպքում ավելի մեծ բարձրություններում և բարձր խոնավության պայմաններում վարակվածությունն ավելի փոքր է:

Երևանի հավաքած ողջ նյութը խիստ վարակված է եղել էկտոմակաբույծներով՝ մողեսային տզերով (*Sauronyssus saurarum*): Գեղարդի պոպուլյացիայում տզեր չեն հայտնաբերվել: Նյութի հավաքի ժամանակաշրջանը համընկնում է տզերի ձվերից պրոտոնիմֆաների դուրս գալուն, որոնք էլ հանդիսանում են ակտիվ սնվող փուլ և վարակման հիմնական աղբյուր:

Մեծ է նաև անթրոպոգեն՝ մարդածին գործոնի ազդեցությունը (արդյունաբերական թափոններ, քիմիական նյութեր, կանաչապատ տարածքների կրճատում), ինչը բերում է շրջակա միջավայրի ընդհանուր (օդի, հողի, ջրի) աղտոտման: Կենդանիների բնական կենսամիջավայրերի ամբողջականության խախտումն ու կրճատումը առաջ են բերում սթրեսային իրավիճակների, որը թուլացնում է իմունային համակարգը և ակտիվացնում մակաբույծներին: Երևանի տարածքը շատ ավելի աղտոտված է, քան Գեղարդինը: Դա էլ իր հերթին ցույց է տալիս արյան մակաբույծների կախվածությունը շրջակա միջավայրի պայմաններից:

Այսպիսով, ուսումնասիրության արդյունքներից պարզ է դառնում, որ մակաբուծային վարակվածությունն ուղղակիորեն կապված է էկոլոգիական պայմաններից և էկտոմակաբույծներից, իսկ սեռից կախվածություն մակաբուծությունը տվյալ աշխատանքում հակասում է մինչ այդ գրականության մեջ եղած տվյալներին:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. *Հարությունյան, Թ.Կ.*, Ժայռային մողեսների (*Darevskia raddei* և *Darevskia portchinskii*) մակաբույծներով վարակվածությունը՝ կախված սեռից և տեսակից, *LXIII*, 2, 2011:

2. *Бейер Т.В., Селиванова Г.В.* Цитофотометрическое исследование количества ДНК в ядрах гемогрегарин из диплоидных и триплоидных скальных ящериц Армении. Цитология, *XI*, 739-743 ст., 1969.
3. *Беклемишев В.Н.* Определитель членистоногих, вредящих здоровью человека. М., Мысль, 308 с., 1958.
4. *Догель, В.А.* Общая паразитология. 3-е издание, переработанное и дополненное Полянским Ю.И. и Хейсиным Е.М., Л., Изд-во ЛГУ, 402 с., 1962.
5. *Красильников Е.Н.* Паразиты скальних ящериц Кавказа. Сб. научн. работ Волгоградск. пед. инст., *2*, 84-90, 1967.
6. *Подшивалов, А.А., Ни Г.В.* Паразиты крови птиц Оренбургской области. Материалы Меж рег. науч. конф. “Паразитологические исследования в Сибири и Дальнем Востоке”, Новосибирск, с. 149, 2002.
7. *Anderson L.L., Ford J.J., Melampy R.M.* Maintenance of pregnancy in rats on deficient diets. J. Reprod. Fertil. May; *38,* 1, 11-20, 1974.
8. *BajerA., Pawelczyk A.et al.* Factors affecting the component community structure of haemoparasites in bank voles (Clethrionomys glareolus) from the Mazury Lake District region of Poland." Parasitology, *122*, 43-54, 2001.
9. *Bennett Gordon F., Cameron Marilyn.* Seasonal prevalence of avian hematozoa in passeriform birds of Atlantic Canada.Canadian Journal of Zoology, 1974, 52, 10), 1259-1264, 10.1139/z74-167.
10. *Bennett G.F., Okia N.O., Ashford R.G., Campbell A.G.* Avian Haemoproteidae. II. Haemoproteus enucleator sp. n. from the kingfisher, Ispidina picta (Boddaert)., J Parasitol. Dec; *58*, 6, 1143-7, 1972.
11. *Beyer T.V. and Sidorenko N.V.* Karyolysus sp. (Haemogregarinidae, Adeleida, Apicomplexa): host-parasite relationships of persisting stages. J. Protozool. *31*, 513–517, 1984.
12. *Crofton* A model of host-parasite relationships. Dec; *63*, 3, 343-64, 1971.
13. *Darevsky I.S.* Systematics and ecology of rock lizards (Lacerta saxicola Eversmann) in Armenia [in Russian]. Zool. sb. AN Armenia SSR, *10*, 27-57, 1957.
14. *Forbes M., P.J. Weatherhead, et al.* Blood parasites of blue grouse: variation in prevalence and patterns of interspecific association." Oecologia, *97,* 520-525, 1994.
15. *Fuller C.A.* Population dynamics of two species of Eimeria (Apicomlexa: Eimeriidae) in deer mice (Peromyscus maniculatus): biotic and abiotic factors.J. Parasitol. *82,* 220-225, 1996.
16. *Lang, J.D.* Factors affecting the seasonal abundance of ground squirrel and wood rat fleas (Siphonaptera) in San Diego County. California, J. Med. Entomol., *33*, 790-804, 1996.
17. *Sevinç M., Urtah, U,S., Yldrmhan, H.S.* Morphological Observations on the Erythrocyte and Erythrocyte Size of Some Gecko Species, Turkey, Asiatic Herpetological Research *10*, pp. 217-223, 2004
18. *Tinsley R.C.* The effects of host sex on transmission success. Parasitol. Today,190-195, 1989.

Ստացվել է 11.03.2013

Հայաստանի Գիտությունների Ազգային Ակադեմիա
Национальная Академия Наук Армении
National Academy of Sciences of Armenia

Հայաստանի Կենսաբանական Հանդես
Биологический Журнал Армении
Biological Journal of Armenia

 Համառոտ հաղորդումներ *Краткие сообщения*   *Short communications*

Biolog. Journal of Armenia, 3 (65), 2013

APPLICATION OF MICROSATELLITE MARKERS FOR VARIETAL IDENTIFICATION GRAPE ROOTSTOCKS: PRELIMINARY ANALYSIS

DALLAKYAN M.V.[1], YESOYAN S.S.[1], HARUTYUNYAN F.A.[3], MELYAN G.H.[2], YESAYAN A.H.[1], HOVHANNISYAN N.A.[1]

1. Department of Ecology and Nature Protection, Faculty of Biology, Yerevan State University, bionellibiotech@yahoo.com; 2. Scientific Center of Viticulture, Fruit-Growing and Wine-Making; 3. Armenian National Agrarian University

In this study the possibility of application of SSR marker sets for grape rootstock identification in diverse genetic material was assessed. 65 rootstocks of 7 table grape varieties were investigated. The results of preliminary study prove the usefulness SSR marker sets for grape rootstocks identification and might be further optimized and studied in more details.

Grape – rootstock – microsatellite marker – genetic profile

Ուսումնասիրվել է միկրոսատելիտային մարկերների կիրառելիությունը խաղողի տնկի-ների մաքրասորտության որոշման համար: Ուսումնասիրվել է խաղողի 7 սորտի 65 նմուշ: Նախ-նական հետազոտությունների արդյունքները ցույց են տվել միկրոսատելիտային մարկերների կիրառելիությունը տնկիների նույնականացման համար և կարիք ունեն օպտիմացման ու հետագա ուսումնասիրության:

Խաղող – տնկի – միկրոսատելիտային մարկեր – գենետիկական պրոֆիլ

Изучена применимость микросателлитных маркеров для сортовой идентификации посадочного материала винограда. Проанализировано 65 образцов 7-и сортов винограда. Предварителньные результаты показали применимость микросателлитных маркеров для сортовой идентификации посадочного материала винограда и требуют дальнейшего изуче-ния и оптимизации.

Виноград – посадочный материал – микросателлитый маркер – генетический профиль

Grapevine (*Vitis vinifera* L.) is one of the economically important crops cultivated around the world. According to certain data sources, there are some 5,000-6,000 cultivars of *Vitis vinifera* are known globally (Alleweldt and Dettweiler 1994).

The fast vegetative propagation has supported widespread distribution of different cultivars in the world (Dion1977; Fregoni 1991). As a result some cultivars have more than 100 synonyms, and numerous homonyms also exist (http://www.genres.de/idb/vitis/). In addition, the different languages used in the east European countries produce different spellings of the same variety name, which may have caused double registering. Simultaneously accurate identification of accessions is a most important issue for the sustainable conservation, management and use of germplasm, the clarification of synonymy, homonymy, and misnaming is a significant problem in the grapevine collections that exist worldwide (Dettweiler et al. 2000a).

The identification of grape cultivars has traditionally been based on ampelography, which is the analysis and comparison of morphological characters of leaves, shoot tips, fruit clusters, and berries (Boursiquot and This 1996; IPGRI UPOV OIV 1997; Galet

2000). Some genetically related cultivars are morphologically very similar and difficult to differentiate by visual comparison (Aradhya et al. 2003). On the other hand, intravarietal clones can differ considerably in phenotype even though they have virtually identical DNA profiles (Vignani et al. 1996; Franks et al. 2002; Riaz et al. 2002).To overcome these limitation molecular biology approaches has been used as molecular markers and DNA barcodes to differentiate, characterize, and identify grapevine accessions. Microsatellite markers (Sefc et al. 2000; Aradhya et al. 2003; This et al, 2004) are favored among RFLP, AFLP or RAPD markers because of their combination of polymorphism, reproducibility, and their codominant nature (Sefc et al. 2001). GENRES081 was a European Union research project focused on the compilation, standardization, and exchange of information concerning grapevine genetic resources (Dettweiler et al. 2000b; This and Dettweiler 2003; http://www.genres.de/vitis/) was developed reference microsatellite profiles for true-to-type identification of grapevine accessions.

The aim of this study was to assess applicability of microsatellite markers for grape variety identification within genetically diverse rootstocks.

Materials and methods. Within collaboration with ''Maran'' wine making company and Scientific Center of Viticulture, Fruit-growing and Wine-making and under the project financed by Armenian Harvest Promotion Centre 65 mixed rootstocks of 7 raisin grape varieties were analyzed. The leaf samples were collected from Dalaril, Eraskhahun, Tandzut, Bmbakashat, Mec Armair, Vrein Artashat, Arevik regions. The leaves of grape verieties from living collection were used as references (Deghin Yerevni, Sev Kishmis, Karmir Icaptuk, Parvana, Marmari, Caradguyn Yerevni). DNA from leaves were extracted by using modified by us cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) (Doyle & Doyle, 1987) with addition of 2% PVP to remove polyphenols. 50-100 mg of fresh tissue were homogenized using homogenizer Tissue Lyzer LT (Qiagen) to avoid cross contamination among samples. Extracted DNA quantity and quality were evaluated using Multiskan Microplate Spectrophotometer (Thermo Scientific). In addition, 10 µl of each DNA extract will be loaded and visualized on a 2% agarose gel. The following SSR primers were analyzed for grapevine cultivars genetic profiling and identification: VVS2 (Thomas and Scott, 1993), VVMD5, 7 (Bowers et al, 1996), VVMD25, 27, 28, 32 (Bowers et al, 1999), ZAG62 and ZAG79 (Sefc *et al,* 1999). These are di-nucleotide repeat sequence motifs with allele sizes ranging from 129 bp (the smallest with VVS2) through to 315 bp (the largest for VVMD36). Amplification were performed on standard PCR (Techne, gradient termal cycler) in 20 µl reactions in 96 well plates. For PCR the Type It Mcrosatellite Kit (Qiagen) was used added with 0.25 µM ofeach primer and 50 ng genomic DNA. PCR products will be analyzed in Qiaxcel system using DNA high resolution kit, by method OM700 by with injection time 5-7 minutes.

Results The preliminary results of the comparison of genetic profiles allowed dividing studied rootstocks into the three groups. The first group comprises 85% of the studied rootstocks and includes genetically identical to the reference varieties rootstocks.

The second group comprises around 15% where genetic profiles of studied rootstocks are differing from those of reference varieties. This proves that these rootstocks might be the clones of the varieties and cannot be further used for planting and production purposes, but might be interesting sources for breeding programmes. Within the third group the rootstocks with absolutely different genetic profiles were included.

So, the results of preliminary study proves the usefulness of SSR marker sets for grape rootstocks identification and might be further optimized and studied in more details.

REFERENCES

1. Alleweldt G, Dettweiler E (1994) The genetic resources of Vitis: world list of grapevine collections, 2nd edn. BAZ IRZ Geilweilerhof, Siebeldingen.
2. Aradhya MK, Dangl GS, Prins BH, Boursiquot JM, Walker AM, Meredith CP, Simon CJ (2003) Genetic structure and differentiation in cultivated grape Vitis vinifera L. Genet Res (Camb) 81:179–192.
3. Boursiquot JM, This P (1996) Les nouvelles techniques utiliser es en amper lographie: informatique et marquage. In: La viticulture a` l'aube du IIIe` me Miller naire. J Int Sci Vigne Vin hors ser rie, pp 13–23.
4. Bowers JE, Dangl GS, Vignani R, Meredith CP: Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (Vitis vinifera L.). *Genome* 1996, 39:628-633.
5. Bowers JE, Dangl GS, Meredith CP: Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape. *Am J Enol Vitic* 1999, 50:243-246.
6. Dettweiler E, Jung A, Zyprian E, ToË pfer R (2000a) Grapevine cultivar MuË ller-Thurgau and its true to type descent. Vitis 39:63–65.
7. Dettweiler E, This P, Eibach R (2000b) The European network for grapevine genetic resources conservation and characterization. In: XXVth World Congress on Grape and Wine, Paris, June 2000, pp 1–10.
8. Dion R (1977) Histoire de la vigne et du vin en France des origins au XIX\gravee me sie` cle. Flammarion, Paris, p 768.
9. Doyle J, Doyle J (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15.
10. Fregoni M (1991) Origines de la vigne et de la viticulture. Musumeci, Quart Italie, p 160.
11. Franks T, Botta R, Thomas MR, Franks J (2002) Chimerism in grapevines: implication for cultivar identity, ancestry and genetic improvement. Theor Appl Genet 104:192–199.
12. IPGRI, UPOV, OIV (1997) Descripteurs de la vigne (Vitis spp.). Union internationale pour la protection des obtentions ver gertales. Gene`ve,Suisse/Office international de la Vigne et du Vin, Paris, France/Institut international des ressources phytoger nertiques, Rome.
13. Riaz S, Garrison KE, Dangl GS, Boursiquot JM, Meredith CP (2002) Genetic divergence and chimerism within ancient asexually propagated winegrape cultivars. J Am Soc Hortic Sci 127:508–514.
14. Sefc KM, Regner F, Turetschek E, Glцssl J, Steinkellner H: Identification of microsatellite sequences in Vitis riparia and their applicability for genotyping of different Vitis species. *Genome* 1999, 42:367-373.
15. Sefc KM, Lopes MS, Lefort F, Botta R, Roubelakis-Angelakis KA, Iban˜ ez J, Pejic I, Wagner HW, GloË ssl J, Steinkellner H (2000) Microsatellite variability in grapevine cultivars from different European regions and evaluation of assignment testing to assess the geographic origin of cultivars. Theor Appl Genet 100:498–505.
16. Sefc KM, Lefort F, Grando MS, Scott K, Steinkellner H, Thomas MR (2001) Microsatellite markers for grapevine: a state of the art. In: Roubelakis-Angelakis KA (ed) Molecular biology and biotechnology of grapevine. Kluwer, Amsterdam, pp 433–463.
17. This P, Jung A, Boccacci P, Borrego J, Botta R, Costantini L, Crespan M, Dangl GS, Eisenheld C, Ferreira-Monteiro F, Grando S, Ib6cez J, Lacombe T, Laucou V, Magalhres R, Meredith CP, Milani N, Peterlunger E, Regner F, Zulini L, Maul E: Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars. *Theor Appl Genet* 2004, 109:1448-1458.
18. This P, Dettweiler E (2003) EU-project GENRES ct96 no81: European Vitis database and results regarding the use of a common set of microsatellite markers. Acta Hortic 603:59–66.
19. Thomas MR, Scott NS: Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequencetagged sites (STSs). *Theor Appl Genet* 1993, 86:985-990.
20. Vignani R, Bowers JE, Meredith CP (1996) Microsatellite DNA polymorphism analysis of clones of Vitis vinifera 'Sangiovese'. Sci Hortic 65:163–169.

Received on 25.08.2013