



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

2015

Լույս է տեսնում 1948 թվականից, հոդվածները հրատարակվում են հայերեն,
ռուսերեն կամ անգլերեն լեզուներով

Выходит с 1948 года, статьи публикуются на армянском, русском
или английском языках

Journal is published since 1948, the articles are published in Armenian,
Russian or English

ԽՄԲԱԳՐԱԿԱՆ ԿՈԼԵԳԻԱ

Է.Ս. Գևորգյան (*գլխավոր խմբագիր*), Ռ.Մ. Հարությունյան (*գլխավոր խմբագրի տեղակալ*), Ա.Ս. Բոյաճյան (*գլխավոր խմբագրի տեղակալ*),

Ա.Յ. Եսայան (*պատասխանատու քարտուղար*), Գ.Գ. Գևորգյան, Ա.Յ. Թռչունյան,
Լ.Ռ. Մանվելյան, Ս.Խ. Մայրապետյան, Ժ.Հ. Վարդանյան.

ԽՄԲԱԳՐԱԿԱՆ ԽՈՐՀՈՒՐԴ

Յու.Թ. Ալեքսանյան, Է.Գ. Աֆրիկյան, Մ.Ա. Դավթյան, Ջ.Ի. Հակոբյան, Վ.Պ. Հակոբյան,
Ս.Հ. Մովսեսյան, Կ.Ս. Պոգոսյան, Գ.Հ. Փանոսյան, Լ.Լ. Օսիպյան

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Յ.Ս. Գևորգյան (*главный редактор*), Ռ.Մ. Арутюнян (*заместитель главного редактора*), Ա.Ս. Բояджян (*заместитель главного редактора*),

Ա.Գ. Есаян (*ответственный секретарь*), Գ. Գ. Գеворкян, Ա.Ա. Трчунян,
Լ.Ր. Манвелян, Ս.Х. Маурапетян, Ж.А. Варданян

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Ю.Т. Алексанян, Э.Г., Африкян, М.А. Давтян, Ж.И. Акопян, В.П. Акопян,
С.О. Мовсесян, К.С. Погосян, Г.А. Паносян, Л.Л. Осипян

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

THE EDITORIAL COUNCIL

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

ԲՈՎԱՆԴԱԿՈՒԹՅՈՒՆ

•Փորձարարական և տեսական հոդվածներ•

Շահինյան Գ.Ս., Մարգարյան Ա.Ա., Փանոսյան Դ.Դ., Թռչունյան Ա.Դ. Հայաստանի և Լեռնային Ղարաբաղի երկրաբանական աղբյուրներից լիպազ արտադրիչ բացիլների մեկուսացումը և բնութագրումը.....	6
Թերլեմեզյան Դ.Լ., Սարգսյան Մ.Ա., Կարապետյան Գ.Ա. Ամոնիֆիկատորների քանակությունը գորշ կիսաանապատային հողերում միջատասպան և սնկասպան պատրաստուկներով ցողումից հետո.....	16
Գաբրիելյան Գ.Ս. Բալենու սորտերի և պատվաստակալների համատեղելիությունը անասնաբուժական տեսանկյունից.....	21
Հարությունյան Տ.Ա. Օխրատոբսին Ա-ի գենաթունային էֆեկտների գնահատումն առնետի ոսկրածուծի բջիջներում <i>in vivo</i>	25
Անտոնյան Ա.Պ., Մինասյանց Մ.Վ., Վարդևանյան Պ.Դ. Poly(dA)-ի կառուցվածքի ուսումնասիրությունը թթվային միջավայրերում.....	29
Սավիլով Պ.Ն. Ազոտային նյութափոխանակությունը փայծաղում բրոնխ տետրաբլոբլեման հեպատիտի դեպքում.....	36
Մարգարյան Լ.Վ. Շիկահող պետական արգելոցի գաստերոիդ բազիդիոմիցետները.....	42
Արծրունի Ի.Գ., Ասատրյան Ա.Լ., Մատինյան Կ.Ս., Գևորգյան Է.Ս. Առնետների թմոցիտներում պոլի(ԱԿՖ-ռիբոզ)պոլիմերազ 1-ի արգելալման հասակային տարբերությունները ցիսպլատինի ներարկումից հետո.....	46
Բալայան Ա.Ս. Մանուկյան Լ.Ս., Ղուկասյան Վ.Տ., Աֆյան Կ.Բ., Անդրեասյան Ն.Ա., Արեւյան Վ.Դ., Աֆրիկյան Է.Գ. Ֆրոկտոօլիգոշաքարների ստացումը օսլայից և ինուլինից ցիկլո-դեքստրինապոլիգլուտրանսֆերազի և իմունոբիլիզացված ինուլինազի իրառամբ....	51
Ալեքսանյան Տ.Ֆ., Գաբրիելյան Ի.Գ., Բազդյան Թ.Վ. Այծուռենին <i>Salix cf. caprea</i> (Salicaceae) Նոր Ազնաբերդի (Հայաստան) միջին պլեյստոցենի տրավերտիններից.....	56
Խաչատրյան Տ.Ս. Գալարմինի դերը թիրեոտրոպ և թիրեոիդ հորմոնների կոնցենտրացիայի փոփոխության առնետների արյան մեջ ենթակլինիկական հիպոթիրեոզի ժամանակ.....	61
Հիտչյան Կ.Վ., Կինոսյան Մ.Դ., Ղազանչյան Ն.Լ., Խաչատրյան Ն.Ս., Գևորգյան Ս.Ա., Հակոբյան Ա.Գ., Դավիդյան Թ.Ս. Մանրենների կոպտուրանների վերականգնողական հատկությունները պահպանման տարբեր մեթոդների դեպքում.....	70
Հայրապետյան Ա.Ս., Ֆայվուշ Գ.Ս., Մուրադյան Ա.Գ. Հազվագյուտ Էնդեմիկ բուսատեսակների ներկայացվածությունը ՀՀ ԳԱԱ Բուսաբանության ինստիտուտի հերբարիումում (ERE). Մաս II. Տվյալներ առանձին տեսակների վերաբերյալ (<i>Alliaceae – Asteraceae</i> ընտ.)	76
Նավասարդյան Դ.Ս. Գերմանիայից և Ավստրիայից Հայաստանի Հանրապետություն ներկրված հողշին, շվից եվ սիմենթալ ցեղերի կովերի արյան հեմատոլոգիական ցուցանիշների համեմատական ուսումնասիրությունը.....	83

•Համառոտ հաղորդումներ•

Սարգսյան Տ.Ա. Ռոմանովյան և հայկական կիսակոպտաբուրդ ցեղերի ոչխարների տրամախաչումից ստացված խառնածինների արյան որոշ ցուցանիշները.....	87
Գյուլխանդանյան Ա.Գ. Ցեղիտի նանոմասնիկները – պորֆիրինների նանոկոնտեյներ են....	90
Հովհաննիսյան Ռ.Լ., Ռուխկյան Մ.Յա Մեծամոր գետի ձկների հելմինթոֆաունան.....	93
Պողոսյան Ա.Դ., Այվազյան Ն.Ս. Խառը լիպիդային երկշերտի կառուցում: ուժային դաշտի մշակում.....	96
Գիտության երախտավորը (ՀՀ ԳԱԱ ակադեմիկոս Էվրիկ Գեղամի Աֆրիկյանի 90-ամյա հոբելյանի առթիվ)	99
Երևելի գիտնականն ու մանկավարժը (ՀՀ ԳԱԱ ակադեմիկոս Լիա Լևոնի Օսիպյանի հոբելյանի առթիվ)	102

СОДЕРЖАНИЕ

•Экспериментальные и теоретические статьи•

<i>Шагинян Г.С., Маргарян А.А., Паносян О.А., Трчунян А.А.</i> Выделение и характеристика липаз-продуцирующих термофильных бацилл из геотермальных источников Армении и Нагорного Карабаха.....	6
<i>Терлемезян Г.Л., Саркисян М.А., Карапетян Г.А.</i> Количество аммонификаторов в бурых полупустынных почвах после опрыскивания инсектицидами и фунгицидом.....	16
<i>Габриелян Г.С.</i> Совместимость сортов вишни и подвоев с анатомической точки зрения.....	21
<i>Арутюнян Т.А.</i> Оценка генотоксических эффектов охратоксина А в клетках костного мозга крыс <i>in vivo</i>	25
<i>Антонян А.П., Минасянц М.В., Вардеванян П.О.</i> Изучение структуры poly(dA) в кислых средах.....	29
<i>Савилов П.Н.</i> Азотистый метаболизм в селезенке при хроническом тетрахлорметановом гепатите.....	36
<i>Маркарян Л.В.</i> Гастероидные базидиомицеты шикаохского заповедника.....	42
<i>Арицруни, И.Г. Асатрян А.Л., Матинян К.С., Геворкян Э.С.</i> Возрастные различия в ингибировании поли(АДФ-рибозо)полимеразы 1 тимокитов крыс после введения животным цисплатина.....	46
<i>Балаян А.М., Манукян Л.С., Кочикян В.Т., Афян К.Б., Андреасян Н.А., Абелян В.А., Африкян Э. Г.</i> Получение фруктоолигосахаридов из крахмала и инулина с применением циклодекстринглюкозилтрансферазы и иммобилизованной инулиназы.....	51
<i>Алексянц Ц.Ф., Габриелян И.Г., Багоян Т.В.</i> Козья ива <i>Salix cf. caprea</i> (Salicaceae) из среднеплейстоценовых травертинов Нор-Азнаберда (Армения).	56
<i>Хачатрян Т.С.</i> Роль галармина в изменении концентрации тиреотропного и тиреоидных гормонов в крови у крыс при субклиническом гипотиреозе.....	61
<i>Читчян К.В., Киносян М.А., Казанчян Н.Л., Хачатурян Н.С., Геворкян С.А., Акопян А.Г., Давидян Т.С.</i> Репродуктивные свойства культур микроорганизмов при разных методах консервации.....	70
<i>Айрапетян А.М., Файвуш Г.М., Мурадян А.Г.</i> Представленность редких эндемичных видов растений Армении в гербарии Института ботаники НАН РА (Ере). Часть II. Информация по отдельным видам (сем. <i>Alliaceae – Asteraceae</i>)	76
<i>Навасардян Д.С.</i> Сравнительная оценка гематологических параметров крови у импортных коров голштинской, швицкой и симментальской пород, завезенных из Германии и Австрии в Армению.....	83

• Краткие сообщения •

<i>Саргсян Т.А.</i> Некоторые показатели крови помесей, полученных скрещиванием романовских и армянских полугрубшерстных пород овец.....	87
<i>Гюльханданян А.Г.</i> Наночастицы цеолита - наноконтейнеры порфиринов	90
<i>Оганесян Р.Л., Рухкян М.Я.</i> К гельминтофауне рыб реки Мецамор.....	93
<i>Погосян А.Г., Айвазян Н.М.</i> Создание смешанного липидного бислоя: разработка силового поля.....	96
<i>Заслуженный деятель науки</i> (В честь 90-летнего юбилея академика НАН РА Эврика Гегамовича Африкяна)	99
<i>Видный ученый и педагог</i> (В честь юбилея академика НАН РА Лии Левоновны Осипян.....	102

CONTENTS

•Experimental and theoretical articles•

<i>Shahinyan G.S., Margaryan A.A., Panosyan H.H., Trchounian A.H.</i> Isolation and characterization of lipase-producing thermophilic bacilli from geothermal springs in Armenia and Nagorno-Karabakh.....	6
<i>Terlemezyan H.L., Sarkisyan M.A., Karapetyan G.A.</i> Quantity of ammonifcators obtained in brown semidesert soils after spraying insecticides and fungicide.....	16
<i>Gabrielyan G.S.</i> Compatibility of cherry varieties and tree stocks from the anatomic viewpoint.....	21
<i>Harutyunyan T.A.</i> Evaluation of genotoxic effects of ochratoxin A in the rat bone marrow cells <i>in vivo</i>	25
<i>Antonyan A.P., Minasyants M.V., Vardevanyan P.O.</i> Study of poly(dA) structure in the acidic media.....	29
<i>Savilov P.N.</i> Splenocytes nitrogenous metabolism in chronic tetrachlormetanic hepatitis.....	36
<i>Margaryan L.V.</i> Gasteroid basidiomycetes of Shikahogh State Reserve.....	42
<i>Artsruni I.G., Asatryan A.L., Matinyan K.S., Gevorgyan E.S.</i> Age-dependent difference in thymocyte poly(ADP-ribose) polymerase 1 inhibition after the <i>in vivo</i> treatment of rats with cisplatin.....	46
<i>Balayan A.M., Manukyan L.S., Ghochikyan V.T., Afyan K.B., Andreasyan N.A., Abelyan V.H., Afrikyan E.G.</i> Obtaining of fructooligosaccharides from starch and inulin by using cyclodextringlucosyltransferase and immobilized inulinase.....	51
<i>Aleqsanyan Ts.F., Gabrielyan I.G., Bagoyan T.W.</i> The Goat willow <i>Salix</i> cf. <i>caprea</i> (Salicaceae) from the Middle Pleistocene travertine of Nor Aznaberd (Armenia).....	56
<i>Khachatryan T.S.</i> The role of galarmin in changing of concentration of thyroid-stimulating hormone and thyroid hormones in rats blood under subclinical hypothyroidism.....	61
<i>Chitchyan K.V., Kinoyan M.H., Ghazanchyan N.L., Khachaturyan N.S., Gevorgyan S.A., Hakobyan A.G., Davadyan T.S.</i> Reproductive properties of microbial cultures at different methods of conservation.....	70
<i>Hayrapetyan A.M., Fayvush G.M., Muradyan A.G.</i> Representativeness of rare endemic plant species in the herbarium of the Institute of botany NAS RA (ERE). Part II. Information on some species (fam. <i>Alliaceae</i> – <i>Asteraceae</i>).....	76
<i>Navasardyan D.S.</i> The comparative estimation of blood hematological parameters for holstein, swiss and simmental cows imported from Germany and Austria to Armenia.....	83

• Short communications •

<i>Sargsyan T.A.</i> Some indicators of blood hybrids obtained by crossing of the Romanovs and Armenian semi-coarse-haired sheep breeds.....	87
<i>Gyulkhandanyan A.G.</i> Zeolite nanoparticles – nanocontainers of porphyrins.....	90
<i>Hovhannisyan R. L., Rukhkyan M. Ja.</i> On the fish helminth fauna of the Metsamor river.....	93
<i>Poghosyan A.H., Ayvazyan N.M.</i> Creation of mixed lipid bilayer: A force field development... 96	
<i>Merited Scientist</i> (In honor of the 90 th anniversary of academician of NAS RA Evrik G. Afrikyan)	99
<i>Eminent scientist and pedagogue</i> (In honor of the anniversary of academician of NAS RA Liya L. Osipyan)	102



Biolog. Journal of Armenia, 2 (67), 2015

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF LIPASE-PRODUCING THERMOPHILIC BACILLI FROM GEOTHERMAL SPRINGS IN ARMENIA AND NAGORNO-KARABAKH

G.S. SHAHINYAN, A.A. MARGARYAN, H.H. PANOSYAN,
A.H. TRCHOUNIAN

Yerevan State University, Department of Microbiology and
Biotechnology of Plants and Microbes
grigorshah@gmail.com

Nine morphologically distinct lipase producing thermophilic aerobic endospore-forming bacteria were isolated from geothermal springs distributed on the territory of Armenia and Nagorno Karabakh. The phenotypic characteristics of the isolates were studied using standard methods. The list of methods include isolation, enrichment and screening for lipase activity, studies of morphological and physiological characteristics of the isolates, phylogenetic studies, software analysis and reconstruction of the phylogenetic tree. The optimal temperature values of studied isolates varied from 55°C-65°C. The phylogenetic diversity of isolates was studied based on 16S rRNA gene analysis. The comparison of generated 16S rRNA gene sequences of the isolates with the ones available in GenBank database indicates their relation to species of genera *Anoxybacillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus* and *Geobacillus*. Four strains identified as *Geobacillus* sp., three strains as *Anoxybacillus flavithermus*, one strain as *Bacillus licheniformis* and one strain as *Brevibacillus borstelensis*.

Thermophilic bacilli – phylogenetic diversity – lipases – geothermal springs

Ինը ձևաբանորեն տարբեր լիպազ արտադրող, ջերմասեր, անէրոբ, սպորառաջացնող բակտերիաներ անջատվել են Հայաստանի Հանրապետության և Լեռնային Ղարաբաղի Հանրապետության տարածքներում գտնվող երկրաջերմային աղբյուրներից: Շտամների ֆենոտիպական հատկանիշներն ուսումնասիրվել են ստանդարտ մեթոդներով: Ուսումնասիրված շտամների համար բարենպաստ ջերմաստիճանային պայմանները տատանվում են 55°C-65°C սահմանում: Մեկուսացված մանրէների ֆիլոգենետիկ բազմազանությունը ուսումնասիրվել է 16S ռԲՆԹ գենների հաջորդականությունների հիման վրա: Ուսումնասիրված շտամների 16S ռԲՆԹ հաջորդականությունների համեմատությունը GenBank տեղեկատվական բազայի նուկլեոտիդային հաջորդականությունների հետ ցույց է տվել այ մանրէների պատկանելությունը *Anoxybacillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus* և *Geobacillus* ցեղերի տեսակներին: Չորս շտամներ նույնականացվել են որպես *Geobacillus* sp. տեսակներ, երեք շտամ՝ որպես *Anoxybacillus flavithermus*, մեկ շտամ՝ որպես *Bacillus licheniformis* և մեկ շտամ՝ որպես *Brevibacillus borstelensis*.

Ջերմասեր բացիլներ – ֆիլոգենետիկ բազմազանություն – երկրաջերմային աղբյուրներ

Девять морфологически разных липазпродуцирующих, термофильных аэробных эндоспорообразующих бактерий выделены из геотермальных источников, распределенных на территории Армении и Нагорного Карабаха. Фенотипические признаки этих штаммов изучены с помощью стандартных методов. Оптимальные значения температуры для исследуемых изолятов варьируют в пределах 55°C-65°C. Филогенетическое разнообразие изолятов изучали на основе анализа генов 16S рРНК. Сравнение генерированных последовательностей генов 16S рРНК изолятов с нуклеотидными последовательностями в базе данных

GenBank указывает на их принадлежность к видам родов *Anoxybacillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus* и *Geobacillus*. Четыре штамма были идентифицированы как виды *Geobacillus* sp., три штамма как *Anoxybacillus flavithermus*, один штамм как *Bacillus licheniformis* и один штамм как *Brevibacillus borstelensis*.

Термофильные бациллы – филогенетическое разнообразие – липазы – геотермальные источники

Thermophilic microorganisms are gaining big industrial and biotechnological interest due to their enzymes (thermozymes) remaining active in harsh industrial processes [1]. The industrial demand for the thermozymes continues to stimulate the search for novel thermophilic microorganisms from various unexplored regions of the Earth, such as deep-sea hydrothermal vents, terrestrial geothermal springs and mud pots [10].

One of the important groups of biotechnologically relevant enzymes is lipases, which have found large applications in food, dairy, detergent, and pharmaceutical industries. Lipases derived from different microbes have been reported for their massive applications, but with the development, the trend has shifted from mesophilic to thermophilic lipases because of their unique attributes [14]. Only small numbers of lipase producing thermophilic microbes have been reported in the last decade. Thus, the screening for new thermostable lipase producers has become a very important task [22].

Thermophilic microorganisms appear in a big list of taxonomic groups and are located on different phylogenetic distances throughout the taxonomic trees of microorganisms [4, 24]. Among the huge diversity of thermophilic bacteria mainly bacilli have been reported as active thermostable lipase producers. Number of thermophilic bacilli species belonging to the genera *Bacillus*, *Geobacillus* and *Anoxybacillus* have been isolated from different geotherms and reported as thermostable lipase producers [3, 11-13, 16, 19, 22, 23, 27].

It is shown recently that Armenian geothermal springs harbored thermophilic microbes from different taxonomic groups including thermophilic endospore-forming bacteria [8, 17, 18]. Despite this progress very little is known about the diversity of microorganisms with lipolytic activity thriving in Armenian geothermal springs.

The present study focuses on the enrichment and characterization of lipase-producing thermophilic bacilli from geothermal springs of Armenia (Akhurik and Tatev) and Nagorno-Karabakh (Karvachar).

Materials and methods. Sampling. Water temperature, pH, and conductivity were measured in situ during the sampling using a portable combined pH/EC/TDS/Temperature tester (HANNA HI98129/HI98130). The geothermal spring in Akhurik is located in northwest Armenia at N 40° 44' 34.04", E 43° 46' 53.95", 1490 m above sea level, with a temperature of ~ 30°C, pH 6.5 and a conductivity 2490 µS/cm (fig. 1.1).). The geothermal spring in Tatev is located in southeast Armenia within the Syunik region at N 39°23.765", E 46°15. 482" with a temperature of ~ 27.5°C, pH 6.0 and a conductivity 2490 1920 µS/cm (fig. 1.2). The spring in Karvachar is located in north Nagorno-Karabakh at N 40°17.417", E 46°27.500" with a temperature of ~ 70°C, pH 7.3 and a conductivity 4600 µS/cm (fig. 1.3). Water and sediment samples were aseptically collected from a shallow part in the outlet of the spring using sterile glass flasks and were maintained on ice until processing.

Isolation and enrichment. To isolate thermophile bacilli 1.0 g of sediment/water samples was suspended in 10 ml of sterile water and mixed for 1 min. Supernatants were transferred to a glass tube with a screw cap and pasteurized at 80°C for 10 min in a water bath. 1.0 ml aliquots were placed on enrichment medium and incubated with shaking (150 rpm) overnight at 55 and 65°C.

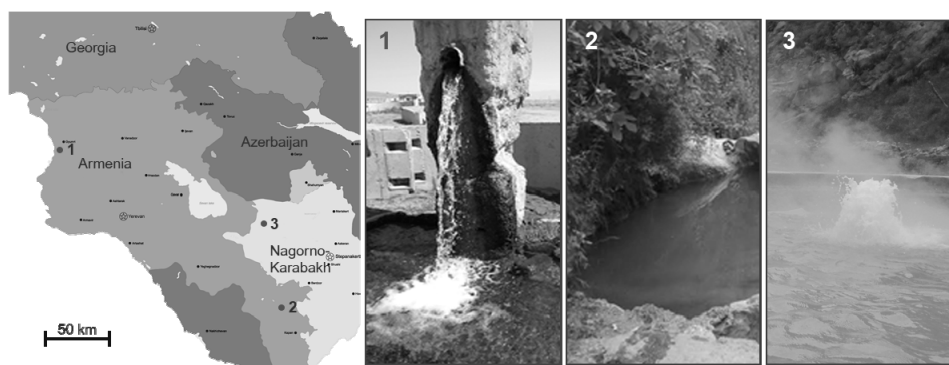


Fig. 1. Location of study sites. Maps of Armenia and Nagorno Karabakh showing locations of studied geothermal springs. 1. Close up photograph of the source pool of Akhurik geothermal spring. 2. Source pool of Tatev geothermal spring. 3. Source pool of Karvachar geothermal spring.

Enrichment medium had following composition: 0.6% nutrient broth (NB) and 1 % Tween 80 or Olive oil as a substrate. Then 0.5 ml aliquots of appropriate dilution were placed on enrichment medium containing 1.5 % agar and incubated overnight at 55 and 65°C. All colonies obtained on plates were picked and purified by streaking on the same medium at least three times. The purified microbial isolates were screened for lipolytic activity on agar plates with lipoidal emulsion containing 6 % olive oil, 0.05 % Tween 80, 0.02 % Rhodamine-B (Alken-Murray). Lipase producing isolates were screened on spread plates after incubation for 48 h at 55 and 65°C. Isolates' colonies exhibiting orange fluorescence zones under UV light at 312 nm were considered as active lipase producers [21].

Phenotypic characteristics of the isolates. Microbial colonies were described by color, size, shape, surface and margins on NB agar. The cell morphology, sporulation and motility were determined by light microscope (Motic 10).

The temperature range for growth was determined after incubation of isolates at temperature from 25 to 75°C with 10°C intervals. The pH dependence of growth was tested at pH range from 4 to 11. The anaerobic growth, catalase and oxidase activity, reduction of nitrate to nitrite, Voges-Proskauer reaction, formation of dihydroxyacetone and indol were determined according to [7]. The utilization of citrate and different substrates as carbon sources (D-glucose, L-arabinose and D-mannitol) was determined using the Simmon's and Hugh Leyfson's medium, correspondingly. The casein and starch hydrolyses were tested by streak glass plate technique. The ability to produce gelatinase was determined using the nutrient gelatin stab method [15].

16S rRNA gene (rDNA) analyses. Extraction of genomic DNA from pure cultures was carried out following to Bacterial genomic DNA isolation using CTAB protocol (Zhou et al., 1996). Extracted DNA was used as templates for amplification of the 27–1492 regions of 16S rDNA sequences by PCR. The “universal” oligonucleotide primers 16SF (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 16S R (5'-GAAAGGAGGTGATCCAGCC-3') were used for amplification of bacterial 16S rDNA. Amplification mixtures were used with a final volume of 50 µl and contained 100 ng DNA, 5µl 10xTaqbuffer, 0.8 mM dNTP mix, 0.5 µM of each primer, 0.5U DyNAzyme II DNA polymerase (Thermo Scientific). Amplification was performed under conditions of an initial denaturation at 95°C for 5 min followed by 30 cycles of denaturation at 95°C for 1 min, annealing at 54°C for 40 s, extension at 72°C for 1 min, with final extension at 72°C for 10 min. The reactions were subsequently cooled to 4°C. The PCR product was analysed on 1.0% agarose gels electrophoresis. PCR products were purified with GenElute™ PCR Clean-up Kit (Sigma).

Sequencing and Phylogeny. Sequencing of bacterial 16S rDNA amplicons were performed on ABI PRISM capillary sequencer according to the protocol of the ABI Prism BigDye Terminator kit (Perkin Elmer) using above mentioned primers. Raw data of DNA sequences were analyzed with program Chromas and BioEdit. The 16S rDNA sequences were aligned and compared with other 16S rRNA gene sequences in GenBank by using the NCBI Basic Local Align-

ment Search Tools, nucleotide (BLASTn) program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Alignment for phylogenetic analysis was made by using ClustalW (Thompson JD 1994). Phylogenetic tree was constructed using the neighbor joining method with MEGA 6.06 software. Bootstrapping analysis for 1000 replicates was performed to estimate the confidence of tree topologies (Felsenstein, 1985).

Results and Discussion. *Isolation and phenotypic characterization.* Collected water/sediment samples were analyzed to evaluate the potential lipase producing aerobic thermophilic endospore-forming bacterial abundance. In total forty one chemoorganotrophic thermophilic aerobic endospore-forming lipase-producer bacilli were isolated from sediment/water samples of Akhurik, Tatev and Karvachar geothermal springs on the enrichment media containing Tween 80 or olive oil. Then isolated bacilli were screened for their lipolytic activity on the media with lipoidal emulsion containing Rhodamine-B as an indicator. As a result nine active lipase producing isolates, designated as Akhurik 106, Akhurik 107, Tatev 65-1, Tatev 65-2, Tatev 65-3, Tatev 65-4, Karvachar QV-1, Karvachar QB-2 and Karvachar QS-1, were selected and further characterized (tab. 1). Isolates were designated according to their geothermal origin, the sample number taken from that origin and the number of the isolates obtained in that sample.

Table 1. Number of bacilli isolates in the media containing Tween 80 or Olive oil

Geothermal spring	Number of isolates on Tween 80 media	Number of isolates on Olive oil media	Number of active lipase producer isolates
Akhurik	10	–	2
Tatev	11	8	4
Karvachar	8	4	3

The screening of active lipase producers on spread plates containing olive oil and Rhodamine-B is shown in fig. 2

The orange fluorescence around the colonies of isolates under UV light indicates active lipase production. The orange fluorescence is a result of reaction of free fatty acids with Rhodamine-B.

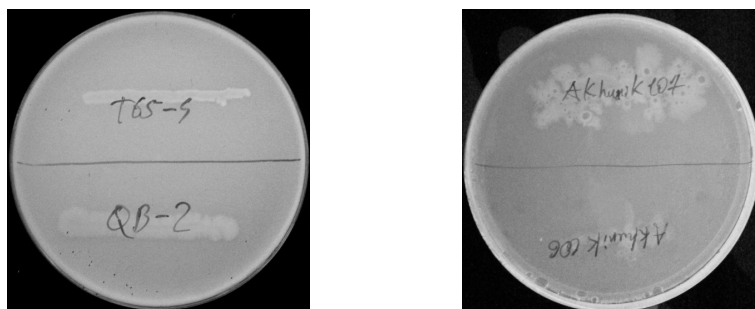


Fig. 2. Detection of lipase production by isolates on plates containing olive oil and Rhodamine-B

All of the isolates were routinely maintained at 4°C on NB agar slants.

Selected lipase-producing isolates were characterized by their phenotypic properties. On solid NB medium isolates differ by colony form, color and surface, thus they form light yellow, white or creamy, circular, smooth or transparent colonies with 0.5-2 mm diameter (tab. 2).

The isolates were gram positive, endospore forming motile rods varying in length between 1.8 to 7.8 μm and in width between 0.5 to 2.0 μm (tab. 3). All isolates were facultative anaerobic and have shown ability to grow in wide range of temperature and pH.

Table 2. Colonies' characteristics of isolates

Isolates	Colonies
Akhurik 106	Irregular, white colored, opaque, flat, smooth surface, lobate margin, homogenous
Akhurik 107	Circular, milky colored, opaque, umbonate, homogenous
Tatev 65-1	Circular, milky colored, opaque, flat, smooth surface, undulate margin, homogenous
Tatev 65-2	Circular, white colored, opaque, flat, smooth surface, undulate margin, homogenous
Tatev 65-3	Circular, white, slightly translucent, flat, smooth surface, undulate margin, homogenous
Tatev 65-4	Circular, white, slightly translucent, flat, smooth surface, undulate margin, homogenous
Karvachar QV-1	Circular, light yellow, opaque, flat surface, entire margin, homogenous
Karvachar QB-2	Circular, light yellow, opaque, umbonate surface, entire margin, homogenous
Karvachar QS-1	Circular, white, opaque, flat, smooth surface, undulate margin, homogenous

The optimal temperature values of studied isolates varied from 55°C-65°C (fig. 3). Isolates Akhurik geothermal springs (Akhurik 106 and Akhurik 107) are also able to grow under 37°C which clearly shows the two strains to be thermotolerants. It is particularly interesting that the isolates from Tatev and Akhurik geothermal springs are optimally growing at temperature of 65°C, even though the native geothermal spring temperature in outlet is around 28-30°C. A temperature >42°C was measured by chemical geothermometers in the deeper of several slim holes drilled up to 1000 m in the regions of Akhurik and Tatev (Henneberger. et al., 2000). A comparison of the optimum growth temperature of the isolates to the water temperature of geothermal spring in the deep suggested that most of the detected microorganisms are likely able to grow at reservoir temperature and, therefore, should not be regarded as contaminants.

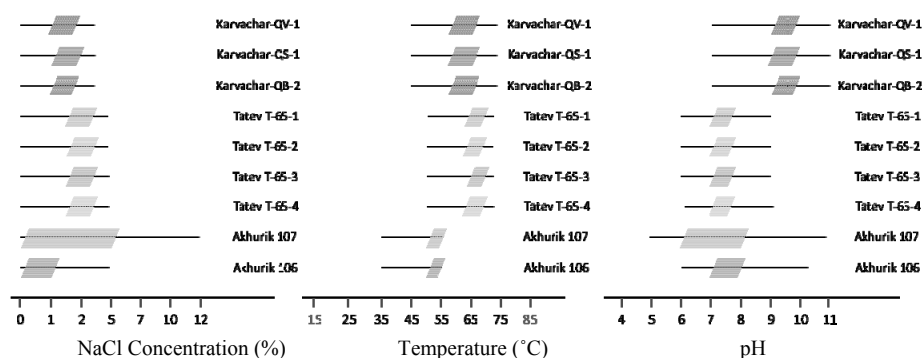


Fig. 3. Temperature (B) and pH (C) ranges of isolates and their growth in different concentration of NaCl (A).

Bacterial isolates grow optimally at pH 7.0 except for Karvachar QV-1, Karvachar QB-2 and Karvachar QS-1 strains, which grow pH optimum is 9.0.

The highest tolerance towards NaCl content in the media was measured on Akhurik 107 also it has the highest optimal concentration of sodium chloride (5%). Other isolates have tolerated 3-5% of sodium chloride concentrations and have shown optimal growth in 0-3% NaCl content in media.

The strain Akhurik 107 was positive according to Voges-Proskauer test, while others were negative. The isolates of Akhurik 107, Tatev 65-1, Tatev 65-2 and Tatev

65-3 formed dihydroxyacetone and reduced nitrate to nitrite. The isolates (except of isolates Tatev 65-1, Tatev 65-2 and Tatev 65-4) hydrolyzed starch and gelatin, the isolate Tatev 65-4 utilized citrate as a carbon source. A list of phenotypic characteristics of the isolates is displayed in the tab 3.

Optimal growth ranges are shown with dashes.

Table 3 . Some phenotypic characteristics of the studied isolates

Phenotypic characteristics	Akhurik 106	Akhurik 107	Tatev 65-1	Tatev 65-2	Tatev 65-3	Tatev 65-4	Karvachar QV-1	Karvachar QB-80-2	Karvachar QS-1
Cell size(μm)									
width	1.5–2.0	1.0-2.0	1.3-1.7	1.2-1.5	1.0-1.5	1.2	1.0	1.0	0.5-0.6
length	4.0–5.0	4.0-5.0	4.0-4.78	4.6-7.82	3.0-3.9	4.25	3.1	1.8	5-6
Endospore form location	Ellipsoidal Central	Ellipsoidal Central	Ellipsoidal Terminal	Ellipsoidal Terminal	Ellipsoidal Terminal	Ellipsoidal Dal Sub-terminal	Ellipsoidal Terminal	Ellipsoidal Terminal	Ellipsoidal Terminal
<i>Swell sporangia</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Voges-Proskauer test</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Nitrate reduction to nitrite</i>	-	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>Hydrolysis of starch</i>	+	+	-	-	+	-	+	+	+
<i>Utilization of citrate</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Formation of dihydroxyacetone</i>	-	+	+	+	+	-	-	-	-

Morphological, biochemical and physiological characteristics of isolates were showed their similarity to the *Bacillus* and related genera. Further molecular identification of bacterial isolates using 16S rDNA sequencing method was carried out in order to recover the phylogenetic relationship between the isolates.

Phylogenetic analyses of the isolates. For further identification of the strains, genomic DNA was purified and 16S rDNA was amplified using 16SF and 16SR primers. The near full-length 16S rDNA nucleotide sequences was aligned against the 16S rRNA sequences in GenBank by using the NCBI BLASTn program. BLAST results for the isolates based on 16S rDNA sequences for identification of the closest relatives in the GenBank database are reported in tab. 4.

Table 4 . Closest phylogenetic affiliation of strains' 16S rDNA based On BLAST comparison to the GenBank database.

Isolate	Sequence length (bp)	Closest phylogenetic match and Accession	Identity %
Akhurik 106	1451	<i>Brevibacillus borstelensis</i> strain AK2 KC503891	99
Akhurik 107	944	<i>Bacillus licheniformis</i> strain HT-Z71-B2 KJ526873	99
Tatev 65-1	1475	<i>Geobacillus</i> sp. WCH70 CP001638	99
Tatev65-2	1480	<i>Geobacillus</i> sp. WCH70 DQ642093	99
Tatev65-3	1477	<i>Geobacillus</i> sp. WCH70 CP001638	99
Tatev65-4	920	<i>Uncultured compost bacterium</i> clone: 2123C1 AB555721	99
Karvachar QS-1	1453	<i>Anoxybacillus flavithermus</i> strain AK1 KC503890	99
Karvachar QV-1	839	<i>Anoxybacillus flavithermus</i> strain AK1 KC503890	98
Karvachar QB-2	1443	<i>Anoxybacillus flavithermus</i> strain AK1 KC503890	99

The BLAST analysis of 16S rDNA sequences revealed close relationship of the isolate Akhurik 106 to *Brevibacillus borstelensis* (99%), the isolate Akhurik 107 to *Bacillus licheniformis* (100%), Tatev 65-1, Tatev 65-2 and Tatev 65-3 isolates to *Geobacillus* sp. (99%), and isolates Karvachar QS-1, Karvachar QV-1 and Karvachar QB-2 to *Anoxybacillus flavithermus* (98-99%). The 16S rDNA sequence of Tatev 65-4 was shown to be similar (99%, 920 bp) with uncultured representative of the Domain Bacteria (Un-cultured compost bacterium clone: 2123C1|AB555721|), even though showing less than 99% similarity with strain *Geobacillus* sp. C170 [FJ848022]. This suggests that isolate Tatev 65-4 may appear to be a novel bacterial species. Additional phylogenetic analyses are necessary to confirm taxonomic affiliation of the isolate.

The phylogenetic tree based on sequences of isolates and reference strains of belonging to genera *Geobacillus*, *Anoxybacillus*, *Bacillus* and *Brevibacillus* is displayed in fig.4.

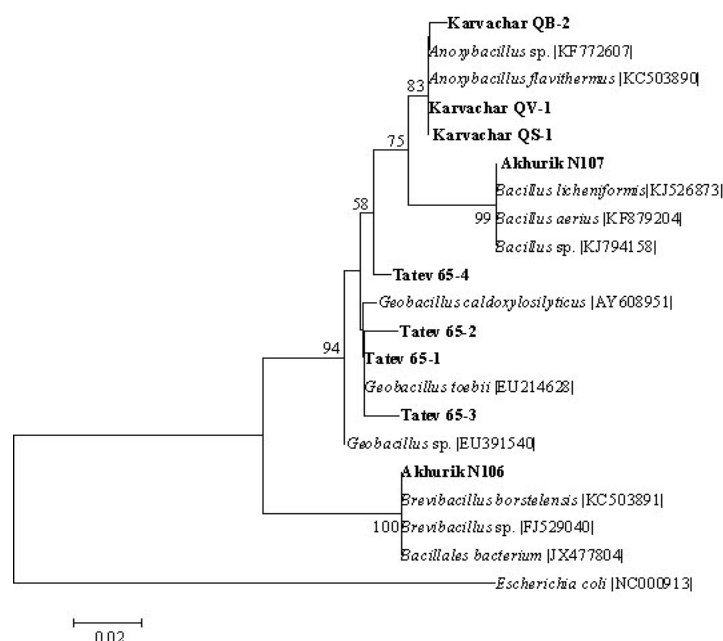


Fig. 4. Phylogenetic tree obtained by distance matrix analysis showing the position of the isolates. The tree was generated by the Neighbour-Joining method using MEGA 6.06 software. Scale bar represents 0.02 substitutions per site.

The phylogenetic tree confirms that isolates Tatev 65-1, Tatev 65-2 and Tatev 65-3 constitute a part of the cluster within one of the thermophilic groups of bacilli (genus *Geobacillus*). Another thermophilic bacilli cluster (with affiliation of species from genus *Anoxybacillus*) contains isolates Karvachar QS-1, Karvachar QV-1 and Karvachar QB-2. A separate clusters contain isolate Akhurik 106 and Akhurik 107, which was affiliated with genera *Brevibacillus* and *Bacillus*, respectively.

Currently, thermophilic aerobic spore-forming bacteria are classified into one genus and seven genera, comprising majority of thermophilic bacilli, including *Geobacillus*, *Anoxybacillus*, *Bacillus* and *Brevibacillus* [2]. which have been found in Armenian and Nagorno Karabakh geothermal springs.

Perhaps BLAST analyses of the sequencing showed the similarity between *Geobacillus* strains isolated from Tatev geothermal spring, in phylogenetic tree they

have different positions (fig. 4). The distance location of the *Geobacillus* strain in the phylogenetic tree could be the evidence for a presence new lipase-producing strain in Tatev geothermal spring. The phylogenetic tree illustrates facts that were not visible on the closest affiliation analysis (BLAST) results. Even though the BLAST has shown the QS-1, QV-1 and QB-2 to be 98-99% similar to *Anoxybacillus flavithermus* strain AK1, the Neighbour-Joining method used has demonstrated the similarity of QS-1 and QV-1 isolates to Uncultured bacterium clone 15-B-30 and the QB-2 is relatively further located on the tree and is much closer to *Anoxybacillus flavithermus* strain AK1. The results indicate the QS-1 and QV-1 isolates to be the same, but yet unstudied strain.

Number of thermophilic bacilli species belonging to the genera *Bacillus*, *Geobacillus* and *Anoxybacillus* have been isolated from different geothermal springs and reported as thermostable lipase producers [3, 11-13, 16, 20, 22, 23, 27]. Previous studies report that *Bacillus thermoamylovorans* CH6B lipolytic enzyme-producing thermophilic micro-organism have been isolated from a hot spring in Galicia (North Western Spain) [5]. Olusesan et al. isolated *Anoxybacillus kamchatkensis* strain KW 12 from Malaysian hot spring and characterized as lipase producers [16]. It seems that the bacilli genera mentioned are the dominating lipase-producing bacterial groups found in different hot springs. Therefore, the potential of *Bacillus*, *Geobacillus*, *Anoxybacillus* and *Brevibacillus* species, as candidates for commercial production of thermostable lipase remains to be explored.

Results show the importance of further investigation of the microbial community structure in Armenian geothermal springs to discover and isolates new thermophilic lipase producing species.

Several geothermal springs distributed on the territory of Armenia and Nagorno Karabakh have been investigated as potential sources of lipolytic enzyme-producing thermophilic bacteria. In the present study, nine thermophilic bacilli have been isolated from Akhurik, Tatev and Karvachar geothermal springs. Certain differentiation phenotypic characters and the ability of lipase production of these isolates were studied and active lipase producing isolates were determined in order to use in further studies. Phylogenetic diversity of isolates as studied based on the 16S rDNA sequence analysis. The isolates showed a close affiliation to the genera *Anoxybacillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus* and *Geobacillus*. Four strains showed maximum similarity with *Geobacillus* sp., three strains with *Anoxybacillus flavithermus* one strain with *Bacillus licheniformis* and one strain with *Brevibacillus borstelensis*.

The present study extends the previous sphere of information regarding the thermophilic bacterial diversity of geothermal springs in Armenia and Nagorno Karabakh.

Acknowledgements. The work was partially supported by Basic support from State Committee of Science, Ministry of Education and science of Armenia, by Armenian National Science and Education Fund (ANSEF-2014 Microbio-3362) based in New York, USA and CPEA-2011/10081 grant from the Norwegian Cooperation Programme in Higher Education with Eurasia.

REFERENCES

1. *Antranikian G.* Industrial relevance of thermophiles and their enzymes. Ed. F. Robb et al. Thermophiles-biology and technology at high temperatures: CRC Press, Boca Raton, p. 113-160, 2008.
2. *Bae S.S., Lee J.-H., Kim S.-J.* *Bacillus alveayuensis* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from deep-sea sediments of the Ayu Trough. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 55, p. 1211–1215. DOI: 10.1099/ijs.0.63424-0, 2005.

3. Berekaa M., Zaghloul T., Abdel-Fattah Y., Saeed H., Sifour M. Production of a novel glycerol-inducible lipase from thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* strain-5. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, p. 287-294, 2009.
4. Chakravorty D., Patra S. Attaining extremophiles and extremolites: methodology and limitations. Ed. Om V. Singh. *Extremophiles*. Chapter 2: Wiley-Blackwell. N.J. p. 29-94, 2013.
5. Deive F.J., A'lvarez M.S., Mora'n P., Sanroma'n M.A., Longo M.A. A process for extracellular thermostable lipase production by a novel *Bacillus thermoamylovorans* strain. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35, 6. p. 931-941. DOI: 10.1007/s00449-011-0678-9, 2012.
6. Felsenstein J. Phylogenies and the Comparative Method. *The American Naturalist*, 125, p. 1-15, 1985.
7. Gordon R.E., Haynes W.C., Pang C.H.-N. The genus *Bacillus* (*Agriculture handbook*; no. 427), Washington, D.C.: Agricultural Research Service, U.S. Dept. of Agriculture, p. 283, 1973.
8. Hedlund B.P., Dodsworth J.A., Cole J.K., Panosyan H.H. An integrated study reveals diverse methanogens, Thaumarchaeota, and yet-uncultivated archaeal lineages in Armenian hot springs. *Antonie van Leeuwenhoek*, 104, 1. p. 71-82. DOI: 10.1007/s10482-013-9927-z, 2013.
9. Henneberger R., Cooksley D., Hallberg J. Geothermal resources of Armenia. *Proc. World Geothermal Congress.*, Kyushu – Tohoku, Japan, May 28 – June 10. p. 1217-1222. 2000.
10. Horikoshi K., Bull A.T. Definition, Categories, Distribution, Origin and Evolution, Pioneering Studies, and Emerging Fields of Extremophiles. Ed. Koki Horikoshi (ed.), *Extremophiles Handbook*, Springer, New York. p. 4-15. DOI 10.1007/978-4-431-53898-1_2.1, 2011.
11. Kim H.K., Sung M.H., Kim H.K., Oh T.K. Occurrence of thermostable lipase in thermophilic *Bacillus* sp. Strain 398. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 58, 5, p. 961-962. DOI: 10.1271/bbb.58.961, 1994.
12. Lee D.W., Koh Y.S., Kim K.J., Kim B.C., Choi H.J., Kim D.S., Suhartono M.T., Pyun Y.R. Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS Microbiology Letters*, 179, 2, p. 393-400. DOI: 10.1016/S0378-1097(99)00440-1, 1999.
13. Leow T.C., Rahman R.N., Basri M., Salleh A.B. High level expression of thermostable lipase from *Geobacillus* sp. Strain T1. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 68, 1, p. 96-103. DOI: 10.1271/bbb.68.96, 2004.
14. Lotti M. and Alberghina L. Lipases: Molecular structure and function. Ed. Polaina J. and MacCabe A.P. *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications*, Chapter 16: Springer, The Netherlands, p. 264-282, 2007.
15. Netrusov A.I. *Guide to Practical Training on Microbiology*. M.: Academy Publishing, 2005. 608 p. (In Russian).
16. Olusesan A.T., Kamaruzaman L.A., Abubakar F., Abdul Hamid N.S., Radu S., Saari N. Phenotypic and molecular identification of a novel thermophilic *Anoxybacillus* species: a lipase-producing bacterium isolated from a Malaysian hot spring. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 11, p. 1981-1988. DOI: 10.1007/s11274-009-0097-0, 2009.
17. Panosyan H. Phylogenetic diversity based on 16S rRNA gene sequence analysis of aerobic thermophilic endospore-forming bacteria isolated from geothermal springs in Armenia. *Biolog. Journ. of Armenia*, 62, 4. p. 73-80, 2010.
18. Panosyan H., Birkeland N.K. Microbial diversity in an Armenian geothermal spring assessed by molecular and culture-based methods. *Journal of Basic Microbiology*, 54, 11, p. 1240-1250. DOI: 10.1002/jobm.201300999, 2014.
19. Rahman R.N., Leow T.C., Basri M., Salleh A.B. Secretory expression of thermostable T1 lipase through Bacteriocin Release Protein (BRP). *Protein Expression and Purification*, 40, 2. P. 411-416. DOI: 10.1016/j.pep.2005.01.006, 2005.
20. Rahman R.N.Z.R.A., Leow T.C., Salleh A.B., Basri M. *Geobacillus zalihae* sp. nov., a thermophilic lipolytic bacterium isolated from palm oil mill effluent in Malaysia, *BMC Microbiology*, p. 1-10, 2007.

21. Savitha J., Srividya S., Jagat R., Payal P., Priyanki S., et al. Identification of potential fungal strain(s) for the production of inducible, extracellular and alkalophilic lipase, African Journal of Biotechnology, p. 564-568, 2007.
22. Schmidt-Dannert C., Sztajer H., Stocklein W., Menge U., Schmid R.D. Screening, purification and properties of a thermophilic lipase from *Bacillus thermocatenuatus*. Biochim. Biophys. Acta, 1214, p. 43-53, 1994.
23. Sharma R., Chisti Y., Banerjee U.C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. Biotechnol Adv, 19, p. 627-662, 2001.
24. Sharma R., Thakur V., Sharma M., Birkeland N.K. Biocatalysis through thermostable lipases: adding flavor to chemistry. /Ed. T. Shatyanarayana, J. Littlechild, Y. Kawarabayasi. Thermophilic microbes in environmental and industrial biotechnology: Biotechnology of thermophiles, Chapter 34: Springer, New York. p. 905-927, 2013.
25. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. In Mol Biol Evol, 30, p. 2725-2729, 2013.
26. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, 22, p. 4673-4680, 1994.
27. Wang Y., Srivastava K.C., Shen G.J., Wang H.Y. Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus* strain, A30-1 (ATCC 53841). Journal of Fermentation and Bioengineering. 79, 5, p. 433-438. DOI: 10.1016/0922-338X (95)91257-6, 1995.
28. Zhou J. Bruns M.A. Tiedje J.M. DNA Recovery from Soils of Diverse Composition. Applied and Environmental Microbiology. 62, 2, p. 316-322, 1996.

Received on 20.02.2015



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 2(67), 2015

ԱՄՈՆԻՖԻԿԱՏՈՐՆԵՐԻ ՔԱՆԱԿՈՒԹՅՈՒՆԸ ԳՈՐԾ ԿԻՍԱԿԱՆԱՊԱՏԱՅԻՆ ՀՈՂԵՐՈՒՄ ՄԻՋԱՏԱՍՊԱՆ ԵՎ ՄԱՍԿԱՊԱՆ ՊԱՏՐԱՏՈՒՆԵՐՈՎ ՅՈՂՈՒՄԻՑ ՀԵՏՈ

Հ.Լ.ԹԵՐԼԵՄԵՉՅԱՆ, Մ.Ա.ՍԱՐԳՍՅԱՆ, Գ.Ա.ԿԱՐԱՊԵՏՅԱՆ

ՀԳՆ Սննդամթերքի անվտանգության ոլորտի ռիսկերի գնահատման և
վերլուծության գիտական կենտրոն
hlt_arm@yahoo.com

Մանրէաբանական հետազոտություններով հաստատված է, որ ինչպես բակտերիական (BT HM-17) և քիմիական (սպինտոր, պրոտեուս, տասպա) պատրաստուկներով առանձին ցողված, այնպես էլ չցողված (ստուգիչ) ծիրանենու այգիների հողերում ամոնիֆիկատորների քանակությունը մայիսից օգոստոս կրում է դինամիկ փոփոխություն: Պարզված է, որ չցողված տարբերակի համեմատ ցողված BT HM-17 կուլտուրալ հեղուկը 3 ամսով (մայիսից հունիս) խթանում է, իսկ պրոտեուսի ջրային կախույթը 2 ամսով (մայիսից հունիս) ճկում է այգու հողերի ամոնիֆիկատորների քանակությունը: Ծիրանենու վնասատուների և հիվանդությունների դեմ ցողումից չորս ամիս անց (օգոստոս) պատրաստուկներով ցողված և չցողված հողերի ամոնիֆիկատորների քանակությունների միջև հավասարի տարբերություն չի հայտնաբերված:

*Ամոնիֆիկատորներ – ծիրանենու այգիների հողեր – BT HM-17 կուլտուրալ հեղուկ –
քիմիական պատրաստուկներ*

Микробиологическими исследованиями установлено, что как в опрыснутых в отдельности бактериальным (BT HM-17) и химическими (спинтор, протеус, таспа) препаратами, так и в неопрыснутых (контроль) почвах абрикосовых садов численность аммонификаторов с мая по август претерпевает динамические изменения. Выявлено, что по сравнению с неопрыснутым вариантом культуральная жидкость BT HM-17 в течение 3-х месяцев (с мая по июль) стимулирует, а водная суспензия протеуса в течение 2-х месяцев (май-июнь) снижает численность аммонификаторов в почвах садов. Спустя 4 месяца (август) после опрыскивания этими препаратами в численности аммонификаторов в опрыснутых и неопрыснутых почвах достоверной разницы не обнаружено.

*Аммонификаторы – почвы абрикосовых садов – культуральная жидкость
BT HM-17 – химические препараты*

Microbiological studies confirmed that the quantity of soil ammonifiers in the apricot orchard soils change dynamically both in the treated by bacterial (BT HN-17), and chemical preparations (Spintor, Proteus, Taspа) in comparison with the untreated (control) variant. It has been disclosed that the sprayed culture liquid of BT HN-17 stimulates while the aqueous suspension of Proteus depresses the quantity of orchard soil ammonifiers during 2 months period from May to June. No reliable difference is recorded in the quantity of soil ammonifiers between the treated against the apricot pests and untreated (control) variants.

Ammonifiers – soil under the apricot trees – BT-HM-17 – culture liquid – chemical preparations

Ազոտը բույսերի աճն ապահովող քիմիական կարևոր տարր է, որը մտնում է սպիտակուցների, նուկլեինաթթուների, քլորոֆիլի, ֆերմենտների, ԱԵՖ-ի, ինչպես նաև աճը խթանող հորմոնների կազմի մեջ [2, 6]:

Հողում հանդիպող ազոտի տարատեսակ միացություններից (օրգանական և հանքային) բույսերը հիմնականում յուրացնում են ազոտի հանքային միացությունները՝ ամոնիակային աղերն ու նիտրատները [1, 12], ամիդներն ու սահմանափակ քանակությամբ պարզ ամինաթթուները [4]:

Ամոնիֆիկացիան հողում ունի կարևոր նշանակություն և զգալի չափով պայմանավորում է հողի բերրիությունը [1, 3]: Կարյազինայի [7] կողմից հաստատված է դրական բարձր համահարաբերակցական (կոռելյացիոն) կապ ($r=0,89$) հումուսի և ամոնիֆիկացնող մանրէների քանակությունների միջև:

Ազոտի օրգանական միացություններից առավել շատ ամոնիֆիկացվում են սպիտակուցները, քանի որ վերջիններս գտնվում են բոլոր բուսական և կենդանական քիչներում և բնության մեջ ունեն լայն տարածում [1]:

Բազմաթիվ գիտական փաստերից հետևում է, որ բույսերի պաշտպանության ոլորտում կատարվող ուսումնասիրություններում հաճախ կարևորվում է օգտագործվող պատրաստուկների կենսաբանական արդյունավետությունը և անտեսվում ցողման արդյունքում հող թափված թունաքիմիկատների ազդեցությունը հողի բերրիությունը պայմանավորող կարևոր ցուցանիշների վրա: Մինչդեռ վերջիններս ուսումնասիրման ճանապարհով կարելի է կանխատեսել կիրառվող պատրաստուկների ազդեցության անցանկալի հետևանքները:

Ելնելով վերը նշվածից, նպատակ է հետապնդվել բացահայտել ցողված միջատասպան և սնկասպան պատրաստուկների ազդեցությունը ծիրանենու այգիների հողերի ամոնիակ գոյացնող մանրէների՝ ամոնիֆիկատորների քանակության վրա:

Նյութ և մեթոդ: Հետազոտությունների նյութ են հանդիսացել արևելյան պտղակերի բնականորեն մահացած թրթուրներից մեր կողմից անջատված BT HM-17 բակտերիական շտամի հիման վրա պատրաստված կուլտուրալ հեղուկը (տիտր՝ 600 մլ. սպոր/մլ), առևտրային քիմիական պատրաստուկներից սպինտոր (24% խԿ, ծախսի նորման՝ 0,25 լ/հա), պրոտեոն (11% ՅԴ, ծախսի նորման՝ 0,75 լ/հա) միջատասպանները և տասպա (50 % խԵ, ծախսի նորման՝ 0,3 լ/հա) սնկասպանը, ցողված և չցողված (ստուգիչ) ծիրանենու այգիների գորշ կիսաանապատային հողերի ամոնիակ գոյացնող մանրէները:

Հետազոտությունները կատարվել են 2013-2014 թթ. լաբորատոր և դաշտային (Արարատի մարզ, Մրգավան համայնք) պայմաններում: Փորձատեղամասերում ցողումները կատարվել են անիվավոր «50 T» մակնիշի մոտորային սրսկիչով:

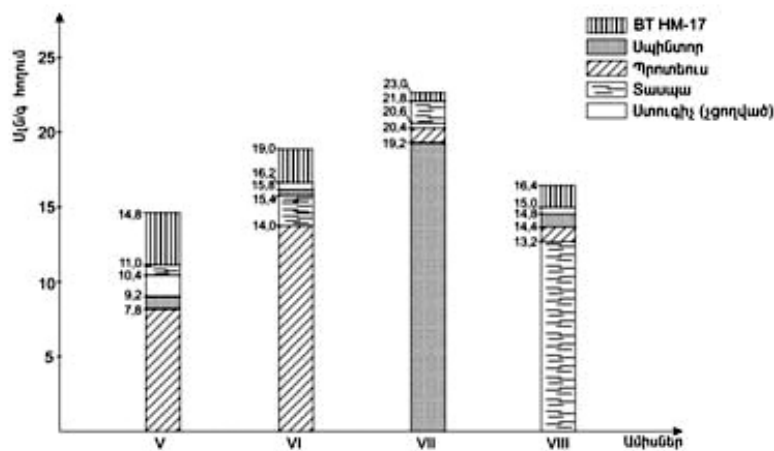
Պեստիցիդներով ցողված և չցողված (ստուգիչ) տեղամասերից հողանմուշները վերցվել են հողաշերտի 0-20 սմ խորությունից: Ամոնիֆիկատորների քանակությունը որոշվել է Պետրիի թասերում, մապեպտոնային ազարի (ՄՊԱ) վրա 5-ական կրկնողությամբ՝ համաձայն Նետրուսովի և այլոց [9]:

Հետազոտության արդյունքները ենթարկվել են վիճակագրական վերլուծության [11]:

Արդյունքներ և քննարկում: Գիտափորձերի արդյունքներից պարզվել է (նկ. 1), որ ամոնիֆիկատորների քանակությունն առանձին ցողված (BT HM-17, սպինտոր, պրոտեոն, տասպա) և չցողված ծիրանենու այգիների գորշ կիսաանապատային հողերում մայիսից օգոստոս կրում է դինամիկ փոփոխություն: Ընդ որում, նշված մանրէների քանակությունը ցողված և չցողված տարբերակներում ավելացել է մայիսից (7,8-14,8 մլ/գ հողում), առավելագույնի հասել հուլիսին (19,2-23,0 մլ/գ հողում) և նվազել օգոստոսին (13,2-16,4 մլ/գ հողում):

Վիճակագրական վերլուծության արդյունքներով հաստատված է, որ BT HM-17 կուլտուրալ հեղուկով ցողված տարբերակում ամոնիֆիկատորների քանակությունները ծիրանենու այգիների գորշ կիսաանապատային հողերում մայիսին (14,8 մլ/գ հողում), հունիսին (19,0 մլ/գ հողում) և հուլիսին (23,0 մլ/գ հողում) արժանահավատորեն գերազանցել են այդ ամիսներին ստուգիչում (չցողված) ցուցաբերված նույնանուն մանրէների քանակությունները (10,4-20,6 մլ/գ հողում) ($P_{0,95}$ և $n=5$ -ի դեպքում Ստյուդենտի $t_{\text{գափանիշ}}$ -ի վերոնշյալ ամիսների հաշվարկային համապատասխան ցուցանիշներ 6,922; 3,272 և 2,600 > 2,571 Ստյուդենտի $t_{\text{գափանիշ}}$ -ի աղյուսակային ցուցիչից):

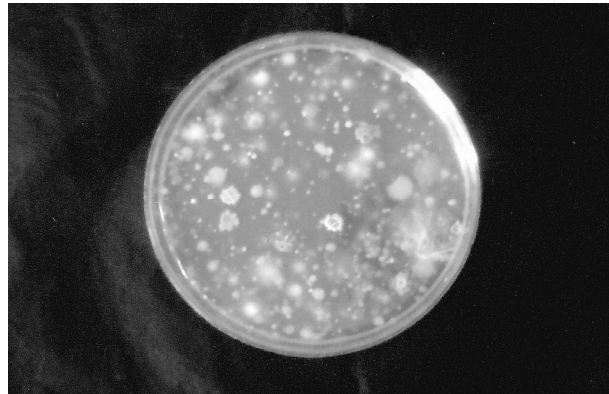
BT HM-17 կուլտուրալ հեղուկով ցողված տարբերակում ամոնիֆիկատորների քանակության ավելացումը ստուգիչի համեմատ, հավանաբար, պայմանավորված է ծառերի ցողման արդյունքում հող թափված ամոնիակ գոյացնող BT տեսակի բակտերիաների և սպիտակուցային բնույթի բյուրեղների առկայությամբ:



Նկ.1. Ամոնիֆիկատորների քանակության դինամիկան ծիրանենու այգիների գորշ կիսաանապատային հողերում միջատասպաններով ցողումից հետո (2013-2014թթ. միջինը):

Միջատասպան բյուրեղի կազմի ինչպես սպիտակուցը (որպես սննդանյութ), այնպես էլ մյուս բաղադրիչները՝ B խմբի վիտամինները (պիրիդոքսին, թիամին, ինոզիտ, քիոտին, պանտոտենային և նիկոտինային թթուներ) [5, 13], միկրոտարրերը (Ni, Cr, Al, Mo, Fe, Pb, Mn, Cu) [8] և առօրինակները [10] ընդունակ են խթանելու հողաբնակ ամոնիֆիկատորների աճն ու զարգացումը:

Նկ. 2-ում ներկայացված է BT HM-17 տարբերակում արձանագրված ամոնիֆիկատորների գաղութների քանակությունը Պետրիի թասում:

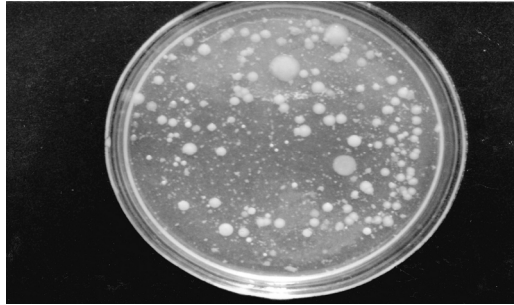


Նկ.2. Ամոնիֆիկատորների գաղութները Պետրիի թասում՝ ՄՊԱ-ի վրա (BT HM-17 կուլտուրալ հեղուկով ցողված տարբերակ):

Ստյուդենտի $t_{\text{գաղութային}}$ -ով հաստատված է, որ պրոտեոնով ցողված տարբերակում ամոնիֆիկատորների քանակությունը մայիսից հունիս (համապատասխանաբար 7,8 և 14,0 մի/գ հողում) ստուգիչի (չցողված) համեմատ (համապատասխանաբար 16,2 և 20,6 մի/գ հողում) արժանահավատորեն նվազել է ($P_{0,95}$ և $n=5$ -ի դեպքում Ստյուդենտի $t_{\text{գաղութային}}$ -ի վերոնշյալ ամիսների հաշվարկային համապատասխան չուցանիշներ 4,655 և 3,086 $>$ 2,571 Ստյուդենտի $t_{\text{գաղութային}}$ -ի աղյուսակային ցուցիչից):

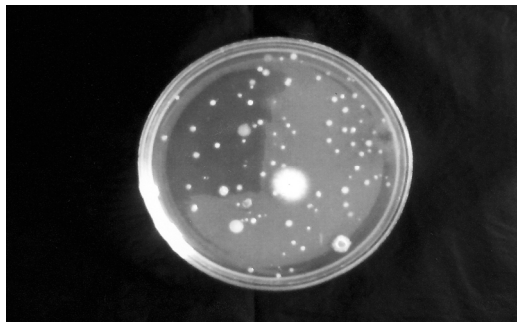
Ամոնիֆիկատորների քանակության նվազումը պրոտեոնի տարբերակում ստուգիչի համեմատ հավանաբար պայմանավորված է ցողված պատրաստուկի ծախսի համեմատաբար բարձր նորմայով (0,75 լ/հա) և ազդող նյութերի (տիակալիդ+դելտամետրին) առանձնահատկություններով:

Նկարներ 3 և 4-ում ներկայացված են համապատասխանաբար չցողված և պրոտեոսով ցողված տարբերակներին բնորոշ ամոնիֆիկատորների գաղութների քանակությունը ՄՊԱ-ի վրա:



Նկ.3. Ամոնիֆիկատորների գաղութները Պետրիի թասում՝ ՄՊԱ-ի վրա (ստուգիչ՝ չցողված տարբերակ):

Գիտափորձերի արդյունքներով հաստատված է, որ հուլիսին տասպա (21,8 մլն/գ հողում), պրոտեոս (20,4 մլն/գ հողում) և սպինտոր (19,2 մլն/գ հողում) տարբերակներում դրսևորված ամոնիֆիկատորների վերոնշյալ քանակություններն արժանահավատորեն չեն տարբերվել ստուգիչի նույնական ցուցանիշի քանակությունից (20,6 մլն/գ հողում) (Ստյուդենտի $t_{\text{չափանիշ}}$ -ի հաշվարկային ընդհանրական ցուցանիշներ $0,152-1,150 < 2,571$ Ստյուդենտի $t_{\text{չափանիշ}}$ -ի աղյուսակային ցուցիչից):



Նկ.4. Ամոնիֆիկատորների գաղութները Պետրիի թասում՝ ՄՊԱ-ի վրա (պրոտեոսով ցողված տարբերակ):

Փորձնական բոլոր տարբերակներում (BT HM-17, պրոտեոս, սպինտոր, տասպա) և ստուգիչում օգոստոսին արձանագրված ամոնիֆիկատորների քանակության ցուցանիշներն ըստ էության եղել են նույնական (Ստյուդենտի $t_{\text{չափանիշ}}$ -ի հաշվարկային ընդհանուր ցուցանիշներ $0,196-1,906 < 2,571$ Ստյուդենտի $t_{\text{չափանիշ}}$ -ի աղյուսակային ցուցիչից):

Այլ կերպ օգոստոսին ստուգիչի համեմատ, փորձնական պատրաստուկներից ոչ մեկը ծիրանենու այգիների գորշ կիսաանապատային հողերի ամոնիֆիկատորների վրա ազդեցություն չի ցուցաբերել:

ՄՊԱ սննդամիջավայրի վրա աճած գաղութների մանրադիտակային (խոշ. $\times 1350$) ուսումնասիրության արդյունքներից պարզվել է, որ ամոնիակ գոյացնող մանրէների գերակշռող քանակությունը կազմել են ոչ սպորավոր (68,2%) և սպորավոր (23,4%) բակտերիաները: Ակտինոմիցետների և միկրոսկոպիկ սնկերի քանակությունները եղել են համապատասխանաբար 7,1 և 1,3%:

Այսպիսով, հետազոտության արդյունքներով հաստատված է, որ ցողումից հետո բակտերիական BT HM-17 կուլտուրալ հեղուկը մայիսից հուլիս (3 ամիս) խթանում է, իսկ քիմիական պրոտեոսը մայիսից հունիս (2 ամիս) ճնշում է ծիրանենու այգիների գորշ կիսաանապատային հողերի ամոնիֆիկատորների քանակությունը:

Պարզվել է, որ ամոնիֆիկատորների ընդհանուր թվաքանակում գերակշռում են ոչ սպորավոր և սպորավոր բակտերիաները, իսկ ակտինոմիցետների և միկրոսկոպիկ սնկերի քանակությունները եղել են զգալի ցածր:

Սույն հոդվածը հրատարակվել է ՀՀ Կրթության և Գիտության նախարարության Գիտության Պետական Կոմիտեի կողմից ֆինանսավորվող 13-4C076 ծածկագրով թեմայի շրջանակում:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. Շաբարյան Գ.Ա., Նուրազյան Ա.Գ. Միկրոբիոլոգիայի դասընթաց: Երևան, Լույս, էջ 103-108, 1964:
2. Միսակյան Ս.Հ. Կենսաբանություն: Երևան, 487 էջ, 1996:
3. Аникиев В.В., Лукомская К.А. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. М., Просвещение, с. 82-86, 1977.
4. Воробьев Д.К., Смирнов П.М. Азотные удобрения. Агрохимия. М., Колос, с. 182-229, 1967.
5. Гукасян А.Б., Туранова Л.К., Саркисян М.А., Сорокина А.Г. Продуктивность кристаллообразующих микроорганизмов в лесных биогеоценозах. В сб.: Микрофлора и перспективы ее использования в повышении продуктивности почв. Красноярск, ИЛиД, с. 5-18, 1978.
6. Двораковский М.С. Экология растений. М., Высшая школа, с.124, 1983.
7. Карягина Л.А. Микробиологические основы повышения плодородия почв. Минск, Наука и техника. 181 с., 1983.
8. Машанов А.И., Томишин А.Т. Микроэлементарный состав некоторых кристаллообразующих бактерий. В сб.: Энтомопатогенные микроорганизмы в лесных биоценозах. Красноярск, ИЛиД, с. 40-44, 1979.
9. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. и др. Практикум по микробиологии, М., ИЦ Академия, 608 с., 2005.
10. Олех С.А. Энтомопатогенная активность *Bac. insectus* Guk. при комбинированном способе борьбы с сибирским шелкопрядом в светлохвойных лесах Тувы: Автореф. дис. канд. биол. наук, Красноярск, 28 с., 1974.
11. Орлов А.И. Прикладная статистика. М., Экзамен, 671 с., 2006.
12. Руссель С. Микроорганизмы и жизнь почвы. М., Колос, с. 112-127, 1977.
13. Сорокина А.Г., Гукасян В.М., Ледникова В.Л. Новая биосинтетическая функция *Bac. insectus* Guk. В сб.: Микрофлора и перспективы ее использования в повышении продуктивности лесов. Красноярск, ИЛиД, с. 65-70., 1978.

Ստացվել է 12.09.2014



Biolog. Journal of Armenia, 2 (67), 2015

COMPATIBILITY OF CHERRY VARIETIES AND TREE STOCKS FROM THE ANATOMIC VIEWPOINT

G.S. GABRIELIAN

National Agrarian University of Armenia
gabrielyan.1978@mail.ru

With the help of anatomical sections it is possible to prove the annual planting material compatibility. According to the data of our experiments the best stock for cherry trees are *Cerasus mahaleb* and *C. microcarpa* seedlings and plants of vegetative propagation. The best compatible varieties are Lubskaya, Podbelskaya and Zhokovskaya.

Cambium – parenchyma cells – callus – xylem – phloem

Անատոմիական կտրվածքների միջոցով հնարավոր է ապացուցել միամյա տնկանյութի համատեղելիությունը: Մեր փորձերի տվյալների համաձայն բալենու համար որպես լավագույն պատվաստակալ հանդիսանում են Բալենի մանրապտուղ և Բալենի մահալեբյան տեսակների սերմնաբույսերը և վեգետատիվ ճանապարհով բազմացող բույսերը: Պատվաստակալների հետ համատեղելի լավագույն սորտերն են Լյուբսկայա, Պոդբելսկայա, Շոկովսկայա:

Чамбирол – паренхимная клетка – каллус – ксилема – флоэма

С помощью анатомических срезов можно доказать совместимость однолетнего посадочного материала. Согласно данным наших экспериментов, лучшим подвоем для вишни являются сеянцы и растения, размножающиеся вегетативным способом, *Cerasus mahaleb* (L.) Mill. и *C. microcarpa* (Pall.) Spach.. Наилучшие совместимые сорта с подвоями – Любская, Подбельская и Жуковская.

Камбий – паренхимные клетки – каллус – ксилема – флоэма

The concept of stock-graft compatibility generally implies the ability of plants for mutual growth after grafting functioning as one integral organism providing the interchange of nutrients. From this point of view the incompatible plants are those which demonstrate short, incomplete joint growth or so-called co-growth (fusion) which is the result of only callus mass intergrowth without connection of conducting elements.

The interrelation of engrafted variety and tree stock often appear to have strongly express singularity. The species of *Cerasus* Mill. genus, including also the ones under our study, have nearly similar wood which is typical of *Prunus* L. genus species composition. The wood of these two genera differ only in insignificant quantitative traits [1, 4].

Materials and methods. The experiments were conducted on 3 species: *C. mahaleb* (L.) Mill., *C. microcarpa* (Pall.) Spach. and *C. incana* (C.A. May) Boiss. species served as a tree stock and Sisiani, Zhukovskaya, Podbelskaya, Lubskaya varieties – as grafts. The anatomical sections

from the grafted area were done with two replications, length-wise and width-wise. Before sectioning the samples were softened in the water by heating for 20 min thereafter were kept them for 10 days in 70.0 % ethyl alcohol, 40.0% formalin, 5.0% acetic acid mix (*FAA*). The cuts were done with *M3-2* (1981) freezing microtome equipped with gas. Thereafter the segments were treated with hematoxylin, eosin, 96% ethyl alcohol, carboxyl, xylol, the permanent preparations were prepared using synthetic protein. Microscope photos were taken. The sections were made at the end of the vegetation. To carry out anatomic sections there were 12 samples taken from different stock-graft pairs. For each sample there were 8-30 permanent preparations prepared. The photos of permanent preparations were taken by binocular microscope at $100\times$ magnification.

Anatomic investigations were carried out by Lotova method [2].

Results and Discussion. After scion budding the ingrowth and further fusion takes place by passing the mentioned phases. At first, 4-5 hours after inoculation the process of mutual growth of scion and stock takes place in the following way: the cells of the stock injured tissues generate callus – an insulating layer which consists of necrotic cells. The callus production takes place more intensive at the section lower part and then at the cut edges. The important role in this process belongs to the cambium cells [3].

The regeneration of the stock bark section depends on the state of the cells that transfer the nutrients. The transversal cut made on the bark obstructs the nutrient movement in the cut place forcing them to move bypassing the injured place. The change in the nutrient flow direction generates the vascular fascicle curve (bend, winding). The larger the transverse section, the more unfavorable conditions are created for the wound healing. Callus production is also observed if the inoculated scion is alive. Since in our experiments the scion budding was performed without wood (spade budding) thus the callus mainly generated at the scion edges, at that, on its lower surface. The callus generates also from nucleus rays, from the scion bark parenchyma. When the graft callus and stock callus join, the fusion takes place. At first the so-called *interstitial tissue* generates that consists of *parenchyma cells*. Thereafter the *vascular fascicles* start developing. In the interstitial tissue area the so-called “window cleft” is formed due to which the vascular elements conjoin. The interstitial tissue can be resolved completely without leaving a trace or remain of big or small size. Complete resorption indicates the complete fusion of the grafted components. The more layers of interstitial tissue remain, the worse the process of fusion is going on. The growing cells tear the insulating layer facilitating the latter decomposition, assimilation and formation of secondary cambium. Connection is established between the conductive systems of the stock and the graft. The cambium layer generates the secondary phloem and xylem. The formation of these tissues indicates the completion of the stock and graft intergrowth (fusion) and free nutrient interchange. The formation of callus is more active at the cut lower part involving the grafted bud level. The fusion and production of new vascular elements of the buds engrafted high goes on relatively slow. Sometimes the scion upper part fails in adhesion irrespective of its lower part strong adhesiveness.

It happens because the scion upper part was drawn into the vascular joint by force and later on it remains “separated, non-conducting” off the nutrient normal interchange, badly provided with nourishment. Besides, the grafted bud, by the polar force, due to its tissue development, activates in its lower part. For successful fusion of the stock and the graft the scion should have not very long lower part (1-1.5 cm) and similar to it or a bit longer upper part. In this case the bud is set in closer to the bark and lower part of the section that provides it better intergrowth.

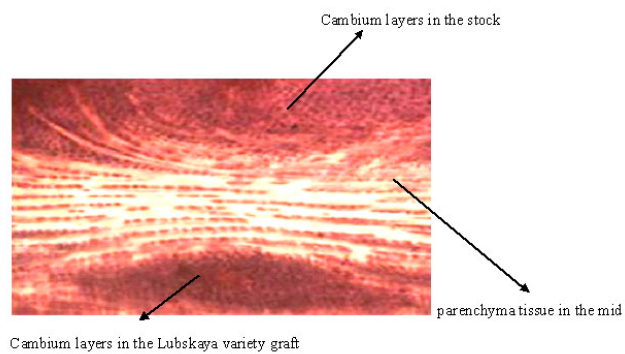


Fig. 1. Cambium layers (with parenchyma tissue in the mid) of *C. mahaleb* stock - Lubskaya variety graft

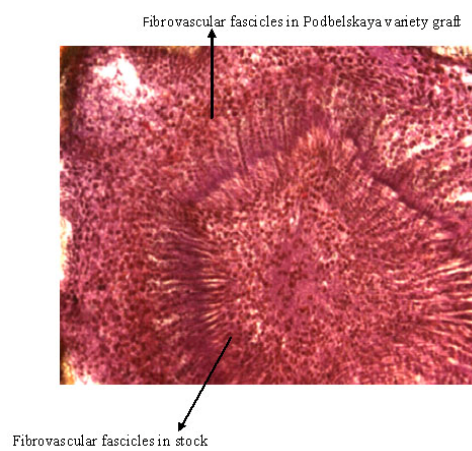


Fig. 2. Joint of *C. microcarpa* stock and Podbelskaya variety graft and formation of fibrovascular fascicles

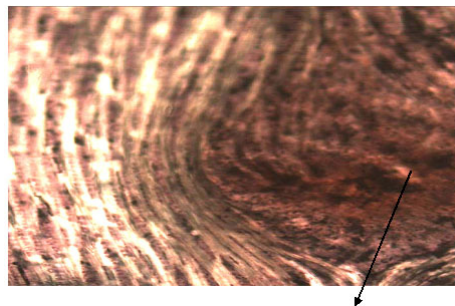


Fig.3. Vessel fusion onset of *C. incana* stock - Zhukovskaya variety graft

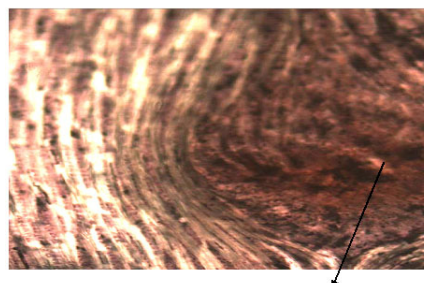


Fig.4. *C. incana* - Sisiani, the insulating layer is torn, the graft and stock drift apart

The photo of incompatible pairs (fig. 4) reveal that in the stock callus there are produced cambium and cork cambium which generates cork cover making impossible the further growth.

The photos of the compatible pairs (fig. 1, 2, 3) reflect the integrated cambium of stock and graft, the integrity of conducting vessels, mutual investing tissue, the insulating layer disappeared.

With the help of anatomical sections it is possible to prove the annual planting material compatibility. According to the data of our experiments the best stock for cherry trees are *Cerasus mahaleb* and *C. microcarpa* seedlings and plants of vegetative propagation. The best compatible varieties are Lubskaya, Podbelskaya and Zhokovskaya.

REFERENCES

1. *Вардanian Ж.А.* Деревья и кустарники Армении в природе и культуре. Ереван, 368 с., 2003.
2. *Лотова Л.И.* Морфология и анатомия высших растений. М., Эдиториал УРСС, 528 с., 2001.
3. *Паутов А.А.* Морфология и анатомия вегетативных органов растений, Санкт-Петербург, 336 с., 2012.
4. *Юшев А.А., Еремина О.В.* Вишня и черешня, М., Ниола-Пресс, 221 с., 2007.

Received on 20.10.2014



Biolog. Journal of Armenia, 2 (67), 2015

EVALUATION OF GENOTOXIC EFFECTS OF OCHRATOXIN A IN THE RAT BONE MARROW CELLS *IN VIVO*

T.A. HARUTYUNYAN

Yerevan State University, Department of Genetics and Cytology
tigr-har@mail.ru

Ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin that contaminates food and feed and has been classified as a possible human carcinogen. Human exposure to OTA is worldwide. Here the genotoxic potential of OTA (4.375 $\mu\text{g/kg}$ body weight/day for 15, 30, and 60 days) in the bone marrow cells of adult Wistar rats exposed to mycotoxin through food consumption was described. Level of DNA damage was measured by using standard alkaline single-cell gel electrophoresis (comet assay). The tail intensity and tail moment of DNA-comets in bone marrow cells were significantly higher in the groups treated for 15 and 60 days than in controls ($p < 0.05$). These parameters were also significantly higher in comparison to the group treated for 30 days ($p < 0.05$). The highest tail intensity and tail moment was observed in animals treated for 15 days, and it differed significantly from animals treated for 60 days ($p < 0.05$). Our results confirm the genotoxic potential of OTA and demonstrate its activity in low concentrations in rat bone marrow cells by comet assay.

Ochratoxin A – mycotoxins – genotoxicity – rat bone marrow cells – DNA comet assay

Օխրատոքսին A (OTA) միկոտոքսին է, որն աղտախարում է սնունդն ու կերերը, և դասակարգվում որպես մարդու համար հնարավոր կանցեռոգեն: Մեր կատարած աշխատանքում ներկայացված է OTA (4.375 մկգ/կգ/օրը) գենաթունային ակտիվությունը Վիստար առնետների ոսկրածուծի բջիջներում, որոնք ստացել են միկոտոքսինը կերի միջոցով 15, 30 և 60 օր: ՂՆԹ-ի վնասվածքների մակարդակը գնահատվել է առանձին բջիջների ժել-էլեկտրաֆորեզի (ՂՆԹ-կոմետ) –ստանդարտ հիմնային մեթոդի կիրառմամբ: Պոչի ինտենսիվությունն ու պոչի մոմենտը հավաստիորեն ($p < 0.05$) բարձր էին 15 և 60 օր մշակված կենդանիների խմբերում համեմատած ստուգիչի հետ: ՂՆԹ-ի վնասվածության այս չափորոշիչները հավաստիորեն ($p < 0.05$) բարձր էին նաև 30 օր մշակված կենդանիների խմբի հետ համեմատած: Պոչի ինտենսիվության և պոչի մոմենտի առավել բարձր մակարդակները դիտվել են 15 օր միկոտոքսինով մշակված կենդանիների խմբում, որոնք հավաստիորեն ($p < 0.05$) տարբերվում էին 60 օր մշակվածներից: Մեր ստացած տվյալները հաստատում են OTA գենաթունային էֆեկտները և ցույց տալիս դրա ակտիվությունը ցածր չափաբաժիններում առնետների ոսկրածուծի բջիջներում ՂՆԹ-կոմետ մեթոդի կիրառմամբ:

*Օխրատոքսին A – միկոտոքսիններ – գենաթունային ակտիվություն –
առնետի ոսկրածուծի բջիջներ – ՂՆԹ-կոմետ մեթոդ*

Охратоксин А (ОТА) является микотоксином, являясь распространенным контаминантом продуктов питания и кормов, классифицируется как потенциальный канцероген для человека. В представленной работе изучена генотоксическая активность ОТА (4.375 мкг/кг/день) в клетках костного мозга крыс линии Вистар, получавших микотоксин вместе с пищей в течение 15, 30 и 60 дней. Уровень повреждений ДНК оценивали методом гелеэлектрофореза в единичных клетках (ДНК-комет). Достоверное ($p < 0.05$) повышение уровня интенсивности и момента хвоста наблюдали у крыс, обработанных в течение 15 и 60 дней, по сравнению с контролем. Данные параметры были также достоверно ($p < 0.05$) выше по сравнению с 30-дневной обработкой. Интенсивность и момент хвоста были наиболее вы-

ражены в группе крыс, обработанной в течение 15 дней, и были достоверно ($p < 0.05$) выше по сравнению с 60-дневной обработкой. Полученные результаты подтверждают генотоксический потенциал ОТА и показывают его активность в низких концентрациях в клетках костного мозга крыс методом ДНК-комет.

*Охратоксин А – микотоксины – генотоксическая активность –
клетки костного мозга крыс – метод ДНК-комет*

Ochratoxins are fungal secondary metabolites produced by several species of *Aspergillus* and *Penicillium*. Most studies on ochratoxins have focused on ochratoxin A (OTA) [1]. Though there are few studies of OTA genotoxicity in experimental animals and the results obtained with cell cultures are inconsistent [2], nowadays it is known that this mycotoxin possesses mutagenic, teratogenic and nephrotoxic activity [3]. The genotoxic status of OTA is still controversial because contradictory results were obtained in various microbial and mammalian gene mutation assays [4].

Most people have detectable levels of OTA in the bloodstream (at least in certain countries), though usually at very low levels. OTA was detected in 100% of human blood samples (maximum 0.04 µg/L) and 58 % of human milk samples (maximum 0.9 µg/L) in Norway [5]. The International Agency for Research on Cancer classified OTA as a 2B group compound (possibly carcinogenic to humans and with sufficient evidence for carcinogenicity in laboratory animals), though the mechanism of its carcinogenicity is not understood completely [6].

The available reports on genotoxicity tested by the DNA-comet assay (single-cell gel electrophoresis) in rat demonstrate the increase of the level of DNA damage in kidney and liver cells, but animals were treated only with a high oral OTA doses (0.5 mg/kg body weight, 10 mg/kg body weight) [2, 7, 8]. Comet assay is a sensitive and operative method for determining DNA strand breaks and alkali labile sites at the cell level *in vitro* and *in vivo* [9]. The method does not require cell cultivation, which makes easier analysis of genotoxicity of different agents in the target tissue.

To our knowledge there is no data on genotoxicity of OTA chronic exposure in rat bone marrow cells in low dose, so the aim of our research is to analyze these effects *in vivo*.

Materials and methods. Adult Wistar rats weighing 200±20g were kept in standard environmental conditions with a 12-h light/dark cycle and at a constant temperature of 24°C, fed a standard diet and had free access to water. The study was approved by the Ethical Committee of the Institute of Molecular Biology of the NAS RA (IRB IORG0003427).

The rats were randomly assigned to four groups of 5 animals each receiving mycotoxin OTA (4.375 µg/kg/day) or solvent only (control group) for 15, 30 and 60 days. The doses of mycotoxins were selected on the base of literature data related to genotoxicity of OTA in rats [7, 8]. 5 rats for each variant were anesthetised by chloroform. For evaluation of genotoxic activity of OTA the left femur was removed and the bone marrow at both ends was exposed with bone cutters. Cells were flushed out with 3 mL PBS (pH 7.4) using a needle and syringe, and the cell suspension was filtered through a three layer bolting cloth [10].

Comet assay. As an anticoagulant heparin was used in ratio 1ml/0.3ml (blood/anti-coagulant). The level of DNA damage was evaluated by standard comet assay method [8]. 20µl of cell suspensions mixed with 0.5% low-melting agarose (80µl) were added to slides pre-coated with 1% normal-melting agarose. After the solidification of gel layer the slides were immersed in a lysis solution (2.5 mol/l NaCl, 100 mmol/l EDTA disodium salt (pH 8.0), 10 mmol/l Tris buffer (pH 10.0) and 1% Triton X-100) at +4°C for 60 min. Slides were placed in electrophoresis buffer (0.3 M NaOH, 1 mM Na₂EDTA, pH 13) for 40 min to allow DNA to unwind. Electrophoresis was performed for 20 min at 300 mA and 1 V/cm. Slides were neutralized with Tris-HCl buffer, pH 7.5, and stained with 20 µg/mL ethidium-bromide.

Slides were examined at 250× magnification on a fluorescent microscope (ZEISS, Germany). At least 150 cells were scored per animal (50 cells scored per each of three replicate slides). Images of comets were recorded with a video camera with high sensitivity (Variocam, PCO, Germany) and processed on a computer program Comet Assay IV (Version 4.3). Tail moment and tail intensity are used to evaluate the extent of DNA damage.

Statistical analysis of the results was performed using SPSS 19 software package with application of non-parametric Mann-Whitney test (U test).

Results and Discussion. We assessed levels of DNA damage and the time course of OTA genotoxicity in the bone marrow cells of animals. The main parameters of DNA damage: tail intensity and tail moment have increased significantly ($p < 0.05$) after 15 and 60 days treatment in comparison to control. These effects was not observed in the group treated for 30 days (fig. 1).

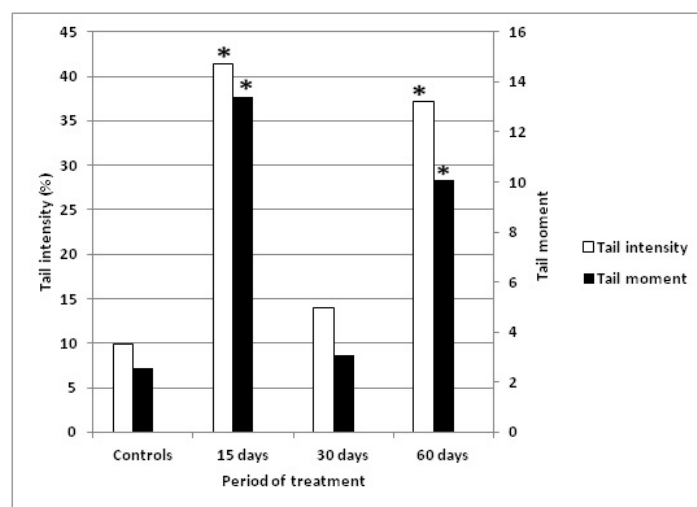


Fig. 1. Levels of DNA damage in rat bone marrow cells after chronic exposure evaluated by comet assay. * $p < 0.05$ - significant difference in comparison to control.

The highest levels of DNA damage were observed after 15 days of treatment. Levels of tail intensity and tail moment are decreasing after 30 days and increasing significantly ($p < 0.05$) after 60 days treatment. These effects could be due to activation of protective mechanisms of organism (e.g. binding and excretion of OTA and its metabolites), which later (after 60 days treatment) failed to prevent genotoxicity of OTA after long term exposure to low dose of mycotoxin. In addition, we showed that comet assay is sensitive method to evaluate genotoxic effects of OTA in rat bone marrow cells after chronic exposure.

Acknowledgements

The work was supported by State Committee of Science of RA (grant#11-1f329). I also would like to express my gratitude to Dr. A. Karapetyan (YSU, Department of Zoology) for support during conduction of experiments on rats, as well as to MetaSystems GMBH company for their permanent technical support.

REFERENCES

1. Bayman P., Baker J.L. Ochratoxins: a global perspective. *Mycopathologia*, 162, 3, 215-23, 2006.
2. Zeljezić D., Domijan A.M., Peraica M. DNA damage by ochratoxin A in rat kidney assessed by the alkaline comet assay. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 39, 12, 1563-8, 2006.
3. Pfohl-Leszkowicz A., Manderville R.A. Ochratoxin A: an overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Mol. Nutr. Food Res*, 51, 61-99, 2007.
4. Dopp E., Müller J., Hahnel C., Schiffmann D. Induction of genotoxic effects and modulation of the intracellular calcium level in syrian hamster embryo (SHE) fibroblasts caused by ochratoxin A. *Food Chem Toxicol*, 37, 7, 713-21, 1999.
5. Breitholtz-Emanuelsson A., Olsen M., Oskarsson A., Palminger I., Hult K. Ochratoxin A in cow's milk and in human milk with corresponding human blood samples. *J. Assoc. of Offic. Analyt. Chem*, 76, 842-846, 1993.
6. IPCS. WHO Food Additives Series. Safety evaluation of certain mycotoxins in food. Geneva: World Health Organization, 2001.
7. Robbiano L., Baroni D., Carrozzino R., Mereto E., Brambilla G. DNA damage and micronuclei induced in rat and human kidney cells by six chemicals carcinogenic to the rat kidney. *Toxicology*, 204, 187-195, 2004.
8. Aydin S., Palabiyik S.S., Erkekoglu P., Sahin G., Başaran N., Giray B.K. The carotenoid lycopene protects rats against DNA damage induced by Ochratoxin A. *Toxicon*, 73, 96-103, 2013.
9. Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.C., Sasaki YF. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*, 35, 3, 206-21, 2000.
10. Smith C.C., Adkins D.J., Martin E.A., O'Donovan M.R. Recommendation for design of the rat comet assay. *Mutagenesis*, 23, 3, 233-40, 2008.

Received on 09.10.2014



Biolog. Journal of Armenia, 2 (67), 2015

STUDY OF POLY(dA) STRUCTURE IN THE ACIDIC MEDIA

A.P. ANTONYAN, M.V. MINASYANTS, P.O. VARDEVANYAN

Yerevan State University, Department of Biophysics
biophys_dep@mail.ru

The study of EtBr (ethidium bromide) interaction with poly(dA) at different pH of solution has been carried out. The obtained data revealed that poly(dA) depending on pH may be in different structural states – double-stranded at $4.0 > \text{pH} > 3.0$ and single-stranded in neutral ($\text{pH} \approx 7.0$), weak acidic ($6.0 > \text{pH} \geq 5.5$) and strong acidic ($\text{pH} < 3.0$) conditions. It was shown that EtBr binds to poly(dA) by intercalation at $\text{pH} \approx 3.5$ as well as semi-intercalation at $\text{pH} \approx 7.0$ and $\text{pH} \approx 5.5$ modes. From the obtained data it was also revealed that EtBr binding mechanisms are universal and practically do not depend on medium conditions.

*Poly(dA) – ethidium bromide –absorption spectrum –intercalation –
semi-intercalation – electrostatic binding*

Իրականացվել է poly(dA)-ի հետ ԷԲ-ի (էթիդիումի իբրոմիդ) փոխազդեցության ուսումնասիրություն լուծույթի տարբեր pH-ների դեպքում: Ստացված տվյալները ցույց են տվել, որ poly(dA)-ն, կախված pH-ից, կարող է գտնվել տարբեր կառուցվածքային վիճակներում՝ երկշղթա $4.0 > \text{pH} > 3.0$ և միաշղթա չեզոք ($\text{pH} \approx 7.0$), թույլ թթվային ($6.0 > \text{pH} \geq 5.5$) և ուժեղ թթվային ($\text{pH} < 3.0$) պայմաններում: Հայտնաբերվել է, որ ԷԲ-ն poly(dA)-ի հետ կապվում է ինտերկալյացիոն), ինչպես նաև կիսաինտերկալյացիոն ($\text{pH} \approx 7.0$) և ($\text{pH} \approx 5.5$) եղանակներով: Ստացված տվյալները նաև ցույց են տալիս, որ ԷԲ-ի կապման մեխանիզմները ունիվերսալ են և գործնականում կախված չեն միջավայրի պայմաններից:

*Poly(dA) – էթիդիումի իբրոմիդ – կլանման սպեկտր – ինտերկալյացիա –
կիսաինտերկալյացիա – էլեկտրաստատիկ կապում*

Исследовалось взаимодействие БЭ (бромистый этидий) с poly(dA) при различных pH раствора. Полученные данные выявили, что poly(dA), в зависимости от pH раствора может находится в различных структурных состояниях – двухцепочечном при $4.0 > \text{pH} > 3.0$ и одноцепочечном при нейтральном ($\text{pH} \approx 7.0$), слабокислом ($6.0 > \text{pH} \geq 5.5$) и сильнокислом ($\text{pH} < 3.0$) условиях. Обнаружено, что БЭ с poly(dA) связывается интеркаляционным при $\text{pH} \approx 3.5$ и полуинтеркаляционным при $\text{pH} \approx 7.0$ и $\text{pH} \approx 5.5$ способами. Полученные данные свидетельствуют о том, что механизмы связывания БЭ являются универсальными и практически не зависят от условий среды.

*Poly(dA) – бромистый этидий –спектр абсорбции –интеркаляция –
полуинтеркаляция – электростатическое связывание*

The studies of interaction of different biological active low-molecular compounds – ligands with canonic forms of nucleic acid are actual topics and they represent a big interest since these compounds significantly effect on structural transitions and functional activity of these macromolecules, particularly DNA. From this point of view some ligands including

ethidium bromide (EtBr), proflavine (PF), acridine orange (AO) have a wide application. The biological activity of these compounds is conditioned by intercalation mode of binding with DNA which invokes structural reconstructions in DNA. Moreover these compounds bind to DNA by several modes. It was revealed that EtBr may bind to single-stranded DNA as well by more than one mode [2, 4, 10, 12, 14, 19, 20, 23, 25]. That is why many theoretical and experimental works are dedicated to EtBr interaction with DNA [2, 4, 10, 12, 14, 19, 20, 23, 25], but the binding of this ligand with different non-canonic forms of DNA is not entirely studied.

After the finding out of DNA structural organization, it becomes an object of numerous investigations in consequence of which it has been revealed that besides canonic Watson-Crick double helixes there are also double helixes consisted of one-type nucleotides [7,16-18]. Incidentally depending on the type of azotic bases, single-stranded ordered structures may be formed. Furthermore from one-type polynucleotides in some cases (depending on ionic strength, pH of solution or existence of different mixtures) double-, three- or four-stranded structures are formed [1, 8, 11, 24]. From this point of view poly(dA) represents a certain interest because its structure at acidic values of pH of solution is not sufficiently studied [16]. In the solution it may be in both single-stranded (ss-) and double-stranded (ds-) states depending on pH of solution.

The goal of the present work is to study EtBr binding to poly(dA) at different values of pH of solution and to evaluate structural peculiarities of this polynucleotide as well as to determine values of the binding constant K and the number of bases n per one binding site for EtBr on this polynucleotide.

Materials and methods. Poly(dA) "Sigma" (USA), EtBr "Serva" (Germany), NaCl, Na-citrate, ethylenediaminetetraacetate (EDTA) (ultrapure) were used in this work. All preparations were used without further purification. Concentrations of used preparations were determined by absorption spectroscopy method, using the following extinction coefficients: $\epsilon_{260}=10.1 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for poly(dA), $\epsilon_{480}=5800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for EtBr. The investigations were carried out in $0.1 \times \text{SSC}$ (standard salt-citrate solution containing 0.015 M NaCl, 0.0015 M Na-citrate (three-substituted), 10^{-5} M EDTA), the ionic strength was equal to 0.02 M. All measurements were carried out at room temperature 25°C and neutral ($\text{pH} \approx 7.0$) and acidic ($\text{pH} \approx 5.5$; $\text{pH} \approx 3.5$; $\text{pH} \approx 2.5$) values of solution pH. The mentioned values of pH are chosen because poly(dA) at $\text{pH} \approx 7.0$ and in alteration interval $6.0 > \text{pH} \geq 5.5$; $3.0 > \text{pH} \geq 2.5$ was in ss-state, at alteration interval $4.0 > \text{pH} \geq 3.0$ – at ds-state.

Compounds containing a group of aromatic chromophore rings, including EtBr, may form dimers at high concentrations ($>1.5 \cdot 10^{-4}$ M). Taking into account this fact at investigation of EtBr complexes with polynucleotides it is necessary to work with such concentrations of dye that make the dimerization negligible. EtBr total concentration in our experiments was equal to $5 \cdot 10^{-5}$ M, and the concentration of dimers composes almost $\approx 0.1\%$ and it may be ignored.

Spectrophotometric measurements were carried out on spectrophotometer PYE UnicamSP8-100 (England). For these measurements quartz cuvettes with 0.5 ml volume and 1 cm optic pathway length were used. Titration of solutions of studying samples was carried out by micropipette with 10 μl volume ("Hamilton", USA). PH of solutions was measured by universal ionomer EV-74 (USSR) with measuring electrode ESL 63-07.

To obtain the absorption spectra, EtBr concentration remains constant in the solution and polynucleotide concentration enhances with titration. The spectra of EtBr complexes with polynucleotides and pure EtBr were obtained in $400 \leq \lambda \leq 600$ nm wavelength interval. Maximum of pure EtBr absorption corresponds to $\lambda=480$ nm wavelength. With spectrophotometric titration of poly(dA) solution the absorption maximum of EtBr solution decreases and is shifted to longer wavelength interval. Moreover isosbestic point is observed at $\lambda=510$ nm and $\text{pH}=3.5$, at other values of pH isosbestic point is revealed at $\lambda=505$ nm. From some value of C_p/C_0 , where C_p is polynucleotide concentration in the solution, C_0 – EtBr concentration when a maximum shifting to longer wavelength interval stops (at 520-525 nm) and spectra deviate from isosbestic point which indicates that EtBr is in thoroughly bound state.

For determination of r/C_f and r from the absorption spectra of DNA-EtBr complexes, the concentration of non-bound ligand C_f was calculated:

$$\frac{C_f}{C_0} = \frac{A - A_\infty}{A_0 - A_\infty} \quad (1)$$

where A is complex absorption at certain ligand concentration, A_0 and A_∞ – absorption of fully free and bound ligands respectively, $C_0 = C_f + C_b$ – total concentration of EtBr in the solution, $r = C_b/C_p$, C_b – bound ligand concentration, C_p – concentration of nucleotide phosphate groups.

To plot ligand binding curve with DNA the following equation is usually used:

$$r / C_f = K (1 - nr) \left[\frac{1 - nr}{1 - (n-1)r} \right]^{n-1} \quad (2)$$

where K is binding constant, n – number of bases per one binding site [2]. For more precise description of binding of ligands with nucleic acids and determination of K and n , in [2] there was suggested a method which permits linearization of equation (2), and as a result the following expression is obtained:

$$\frac{r}{C_f} = K(1 - (2n-1)r) \quad (3)$$

EtBr binding curves with poly(dA) were obtained by equation (3) at the above indicated pH and the values of K and n were calculated as it is described in [21]. To receive the above mentioned values of pH the solutions were titrated by 0.2 N HCl, adding 2 μ l acid each time and mixing on magnetic stirrer. Error of final values of pH of solutions does not exceed ± 0.02 . Experimental error does not exceed 10-15%.

Results and Discussion. Many theoretical and experimental works are devoted to EtBr binding studies with DNA. It has been shown that this ligand forms different types of complexes with DNA – intercalation, semi-intercalation, electrostatic etc. [10, 20, 23]. Moreover it was shown that EtBr binding mechanisms with DNA are universal and are realized independently on different factors of medium (ionic strength, pH, nucleotide sequence) [3, 15]. Based on this EtBr was chosen as an appropriate ligand for poly(dA) structure investigation. This polynucleotide possesses several structural peculiarities. At alkaline, neutral or strong acidic pH values of the solution poly(dA) is mainly in single-stranded state but in $4.0 > \text{pH} > 3.0$ interval this polynucleotide protonating transmits to double-stranded state since separate chains form pairs in type of $\text{poly(dAH}^-)\text{-poly(dAH}^+)$ as in case of polyriboadenilic acids [7, 16-18]. At higher acidic solutions this polynucleotide again transmits to single-stranded state. Consequently, EtBr binding investigation with poly(dA) at different values of pH may allow to evaluate its structural peculiarities in the solution.

EtBr complex-formation with poly(dA) was investigated by spectrophotometric titration method in the following conditions: $\text{pH} \approx 7.0$; $\text{pH} \approx 5.5$; $\text{pH} \approx 3.5$ and $\text{pH} \approx 2.5$. The absorption spectra of EtBr and its complexes at $\text{pH} \approx 3.5$ (A) and $\text{pH} \approx 7.0$ (B) are presented on fig. 1. As it is obvious from fig. 1A, at $\text{pH} \approx 3.5$ the absorption spectra of poly(dA)-EtBr complexes decrease in maximums and are shifted to long wavelength interval. Besides, an isosbestic point is formed on spectra at $\lambda = 510$ nm. These changes of the absorption spectra of EtBr and its complexes with poly(dA) are similar with those of EtBr complexes with double-stranded DNA at pH neutral values. Moreover, it is obvious from fig. 1B that despite EtBr absorption spectra with poly(dA) at $\text{pH} \approx 7.0$ are subjected to analogous changes as in the case of $\text{pH} \approx 3.5$, they differ from those since decreasing of maximums of the absorption spectra of poly(dA)-EtBr complexes in this case is not big, the shifting to the long wavelength interval is less as well than at $\text{pH} \approx 3.5$. On the other hand, the isosbestic point is formed at $\lambda = 500$ nm. The mentioned changes of the absorption spectra of poly(dA)-EtBr complexes at $\text{pH} \approx 7$ are analogous to those obtained for EtBr complexes

with single-stranded DNA [20, 22]. The absorption spectra of poly(dA)-EtBr complexes at pH $\approx$ 5.5 and pH $\approx$ 2.5 are obtained as well. At pH $\approx$ 5.5 the absorption spectra of poly(dA)-EtBr complexes coincide with those of these complexes obtained at pH $\approx$ 7.0 (spectra are not presented), while the changes of spectra at pH $\approx$ 2.5 are insignificant.

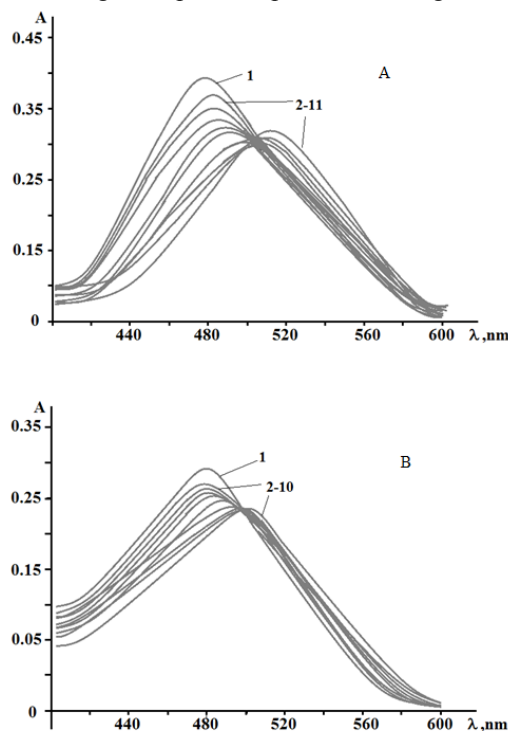


Fig. 1. The absorption spectra of EtBr (1) and its complexes (2-11) with poly(dA) at pH $\approx$ 3.5 (A) and pH $\approx$ 7.0 (2-10) (B). EtBr concentration was equal to $6.9 \cdot 10^{-5}$ M/L at pH $\approx$ 3.5 and $5.2 \cdot 10^{-5}$ M/L at pH $\approx$ 7.0. Concentration ratio of $C = \text{poly(dA)}/\text{EtBr}$ changes in $0 < C \leq 2$ interval.

Based on the absorption spectra of EtBr and its complexes with poly(dA) the binding curves are constructed in Scatchard's coordinates. The binding curve of EtBr with poly(dA) obtained at pH $\approx$ 3.5 is presented on fig. 2A, the curves at pH $\approx$ 7.0, pH $\approx$ 5.5 and pH $\approx$ 2.5 – on fig. 2B. The experimental points obtained at pH $\approx$ 7.0 and pH $\approx$ 5.5 practically coincide with each other.

It is obvious from presented figure that a slope on the binding curve obtained at pH $\approx$ 3.5 is bigger than on the other curves at the rest of pH. The binding curve at pH $\approx$ 2.5 practically does not have a slope. Most probably it is conditioned by the fact that at pH < 3.0 all ionizing groups of not only poly(dA) but also EtBr are in totally protonated state. This results in radical changes of charge density of polyadenilic acid, which has a total electro-negative charge at neutral values of pH (is poly-anion in solutions). EtBr is in cationic form in neutral solutions. At acidic values of pH an increasing of total electropositive charge of EtBr takes place in consequence of protonation. Based on this it may be assumed that EtBr interaction with poly(dA) at pH $\approx$ 2.5 is insignificant or EtBr molecules in these conditions do not bind to polydeoxiadenilic acid.

At neutral values of solution pH (pH $\approx$ 7.0) as well as at pH $\approx$ 5.5, EtBr binds to poly(dA) by weaker mode than at pH $\approx$ 3.5. It is indicated by the binding constant value (K)

obtained from EtBr binding curves with this polynucleotide. Particularly, at $\text{pH} \approx 3.5$ $K = 9.2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, at $\text{pH} \approx 7.0$ and $\text{pH} \approx 5.5$ – $K = 8.6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$. It is obvious that EtBr binding constant value with poly(dA) at $\text{pH} \approx 3.5$ is higher by one order than at $\text{pH} \approx 7.0$ and $\text{pH} \approx 5.5$. Moreover the value of n is much higher at $\text{pH} \approx 3.5$ – $n = 10.5\text{--}11.0$ than at $\text{pH} \approx 7.0$ and $\text{pH} \approx 5.5$ – $n = 3.5\text{--}4.0$. This value of n is higher at EtBr binding with double-stranded DNA by strong mode ($n = 5\text{--}6$) [20].

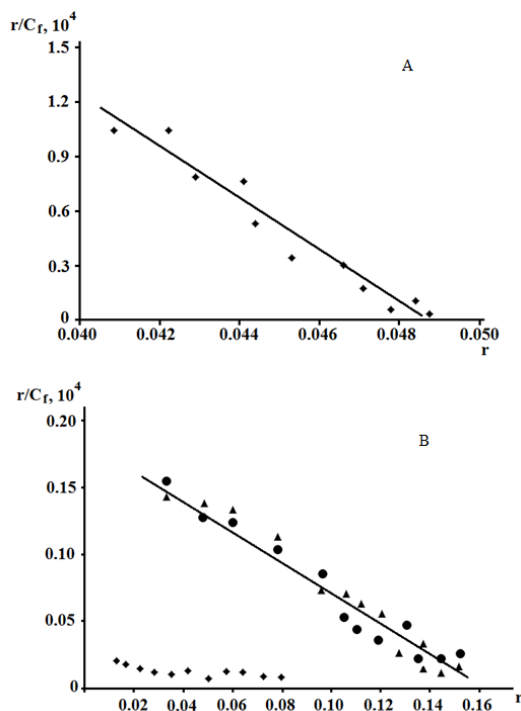


Fig. 2. EtBr binding curves with double-stranded poly(dA) at $\text{pH} \approx 3.5$ (A) and single-stranded poly(dA) at $\text{pH} \approx 7.0$, $\text{pH} \approx 5.5$ and $\text{pH} \approx 2.5$ (B). • corresponds to experimental points obtained at $\text{pH} \approx 7.0$; ▲ – at $\text{pH} \approx 5.5$, ♦ – $\text{pH} \approx 2.5$.

It is known that at $\text{pH} < 4.0$, when protonation of adenine bases takes place [16], polyriboadenilic acid (poly(A)) transmits to double-stranded state due to formation of hydrogen bonds and forms $\text{poly}(\text{AH}^+)\text{--poly}(\text{AH}^+)$. Poly(dA) structure in acidic solutions is studied less than poly(A), but it should not be excluded the fact that poly(dA) may transmit to double-stranded state at protonation of adenilic bases. Taking into the consideration this fact we assume that the obtained values of K and n for EtBr binding to poly(dA) differ from those for DNA-EtBr complexes but at $\text{pH} \approx 3.5$ correspond to intercalation binding mode of this ligand. It is indicated also by strong confinement of binding site number on this polynucleotide. The fact that the value of K at EtBr intercalation into $\text{poly}(\text{dAH}^+)\text{--poly}(\text{dAH}^+)$ differs from that obtained at this ligand binding to double-stranded DNA, most probably, is conditioned by decreasing of electro-negative charge of $\text{poly}(\text{dAH}^+)\text{--poly}(\text{dAH}^+)$ due to protonation, in consequence of which non-canonic helix acquires more embedded packing compared to DNA. On the other hand, EtBr molecules are also protonated in these conditions ($\text{pK}_a \approx 5.5$ for EtBr) and their total electro-positive charge increases (at neutral solutions EtBr is in cationic state) [9]. As a result of mentioned effects at EtBr intercalation into $\text{poly}(\text{dAH}^+)\text{--poly}(\text{dAH}^+)$ electrostatic interaction plays a

significant role which at neutral solutions promotes an intercalation which in its turn is realized by two phases: during the first phase positively charged ligand molecules bind from external side of DNA (with negatively charged sugar-phosphate skeleton), during the second phase these molecules intercalate into the plane between neighbor base pairs [6, 12]. From this point of view in the case of poly(dAH⁺)-poly(dAH⁺), electrostatic interaction obstructs intercalation process since the binding constant value decreases. Incidentally it was shown that EtBr preferably intercalates into pyrimidine-purine sequences compared to purine-pyrimidine sequences [5]. Poly(dAH⁺)-poly(dAH⁺) is double-stranded helix consisted of purine bases in result of which, in all appearances, intercalation sites for EtBr molecules become confined.

At pH≈7.0 and pH≈5.5 the value of *K* is less by one order than at pH≈3.5. This fact is conditioned by the fact that this polynucleotide in these conditions is in single-stranded state and the entire intercalation of EtBr molecules is impossible. Nevertheless we assume that EtBr binds to ss-poly(dA) as in the cases of ss-DNA and ss-poly[d(A-T)] by semiintercalation mode. This fact is maintained by good coincidence of the values of *K* with the same values obtained for semi-intercalation complexes of this ligand with ss-DNA and ss-polynucleotides [20, 22, 23]. As it is obvious from fig. 2B, EtBr binds to ss-poly(dA) by semi-intercalation mode with similar affinity in both neutral and weak acidic conditions, despite at pH≈5.5 ligand molecules are protonated.

Therefore, the obtained data indicate that poly(dA) depending on solution pH may be in different structural states – double-stranded at pH≈3.5 and single-stranded at neutral (pH≈7.2), weak acidic (pH≈5.5) and strong acidic (pH≈2.5) conditions. It was also shown that EtBr binds to poly(dA) by intercalation or semi-intercalation modes depending on structural state of this polynucleotide. These data may become a fundament for evaluation of structures of different polynucleotides that do not have canonic structure. From the obtained data it is also revealed that EtBr binding mechanisms are universal and practically do not depend on medium conditions as it was shown earlier in [15].

REFERENCES

1. *Adrian M., Heddi B., Phan A.T.* NMR spectroscopy of G-quadruplexes. *Methods*, 57, 1, p. 11-24, 2012.
2. *Arakelyan V.B., Babayan S.Yu., Tairyan V.I., Arakelyan A.V., Parsadanyan M.A., Vardevanyan P.O.* Kinetics of ligand binding to nucleic acids. *J. Biomol. Str. Dyn.*, 23, 4, p. 479-484, 2006.
3. *Antonyan A.P.* Acidic denaturation of ethidium bromide complexes with DNA. *Biolog. Journ. of Armenia*, 65, 2, p. 31-35, 2013.
4. *Borisova O.F., Shcholkina A.A., Karapetian A.T., Surovaya A.N.* Heterogeneity of strong binding sites of ethidium bromide on DNA. Fluorescence and non-fluorescence complexes. *Mol. Biol.*, 32, p. 855-862, 1998.
5. *Cantor Ch., Shimmel P.* Biophysical chemistry. M., Mir, 1985.
6. *Chaires J.B.* A thermodynamic signature for drug-DNA binding mode. *Arch Biochem. Biophys.*, 1, 453, p. 26-31, 2006.
7. *Eisenberg H., Felsenfeld G.* Studies on the temperature-dependent conformation and phase separation of polyriboadenilic acid solutions at neutral pH, *J. Mol. Biol.*, 30, p. 17-37, 1967.
8. *Holder I.T., Drescher M., Hartig J.S.* Structural characterization of quadruplex DNA with in-cell EPR approaches. *Bioorg Med Chem.*, 21, 20, p. 6156-61, 2013.
9. *Jones R.L., Wilson W.D.* Effect of ionic strength on the pKa of ligands bound to DNA. *Biopolymers*, 20, p. 141-154, 1981.

10. Karapetian A.T., Mehrabian N.M., Terzikian G.A., Vardevanian P.O., Antonian A.P., Borisova O.F., Frank-Kamenetskii M.D. Theoretical treatment of melting of complexes of DNA with ligands having several types of binding sites on helical and single-stranded DNA. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 14, 2, p. 275-283, 1996.
11. Kim B.G., Shek Y.L., Chalikian T.V. Polyelectrolyte effects in G-quadruplexes: *Biophys. Chem.*, 184, 31, p. 95-100, 2013.
12. Lane A.N., Jenkins T.C. Thermodynamics of nucleic acids and their interactions with ligands. *Q. Rev. Biophys.*, 33, 3, p. 255-306, 2000.
13. Minasyan S.H., 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.
14. Monaco R.R. A Novel Major Groove Binding Site in B form DNA for Ethidium Cation. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 25, 2, p. 119-125, 2007.
15. Mukhaelyan Zh.H., Antonyan A.P., Minasyants M.V. Investigation of acidic denaturation of ethidium bromide complexes with DNA. *Proceedings of the Yerevan state University*, 2, p. 48-53, 2014.
16. Saenger V. Principles of structural organization of nucleic acids. M., Mir, 1987.
17. Saenger W., Rieck J., Suck D. A structural model for the polyadenylic acid single helix. *J. Mol. Biol.*, 93, p. 529-534, 1975.
18. Scovell W.M. Structural and conformational studies of polyribonucleic acid in neutral and acid solution. *Biopolymers*, 17, p. 969-984, 1978.
19. Suh D. Environments of ethidium binding to allosteric DNA: II. Accessibility, mobility and mode of binding. *Exp. and Mol. Medicine*, 32, 4, p. 204-209, 2000.
20. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Davtyan H.G., Karapetian A.T. The binding of ethidium bromide with DNA: interaction with single- and double-stranded structures. *Experimental and Molecular Medicine*, 35, 6, p. 527-533, 2003.
21. Vardevanyan P.O., Arakelyan V.B., Parsadanyan M.A., Antonyan A.P., Hovhannisyan G.G., Shahinyan M.A. Analysis of experimental binding curves of EtBr with single- and double-stranded DNA at small fillings. *Modern Physics Letters B*, 28, 22, p. 1450178 (1-11), 2014.
22. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Davtyan H.G., Boyajyan Z.R., Karapetian A.T. Complex-formation of ethidium bromide with poly[d(A-T)]-poly[d(A-T)]. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 22, 4, p. 465-470, 2005.
23. Veselkov A.N., Baranovskii S.F., Dymant L.N., Petrenko N.V., Veselkov D.A., Taker A., Devis D.B. Complex-formation of ethidium bromide with single-stranded non-complementary deoxitetrannucleotide 5'-d(ApApGpC). *Mol Biol.*, 31, 2, p. 263-273, 1997.
24. Vorlickova M., Kejnovska I., Sagi J., Renciuk D., Bednarova K., Moltova J., Kypr J. Circular dichroism and guanine quadruplexes. *Methods*, 57, 1, p. 64-75, 2012.
25. Xinhui H., Wang Q., Pingang H., Fang Y. Spectroelectrochemistry study on the electrochemical reduction of ethidium bromide. *Analytical Sciences*, 18, p. 645-650, 2002.

Received on 21.01.2015



Биолог. журн. Армении, 2 (67), 2015

АЗОТИСТЫЙ МЕТАБОЛИЗМ В СЕЛЕЗЁНКЕ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ТЕТРАХЛОРМЕТАНОВОМ ГЕПАТИТЕ

П.Н. САВИЛОВ

ТОГБУЗ “Тамбовская ЦРБ”, с. П.Пригородное, Россия
Воронежская государственная медицинская академия, Воронеж, Россия
p_savilov@rambler.ru

Исследовали влияние хронического тетрахлометанового гепатита на азотистый метаболизм в селезёнке. Установили, что в процессе развития хронического CCl_4 -гепатита в селезёнке происходит патологическое накопление аммиака на фоне развития артериальной гипераммониемии. При этом спленоциты не способны через образование глутамина предотвратить накопление в них аммиака, поступающего из артериальной крови и образующегося в результате активации в них внутриклеточного аммонийогенеза. В процессе хронического отравления организма CCl_4 селезёнка приобретает способность к “активному” поглощению свободной мочевины из артериальной крови, с дальнейшим переводом её в связанную форму, а после прекращения токсического влияния на организм повышать образование мочевины селезёночными макрофагами, которое не предотвращает накопления селезёночной аммиака.

Селезёнка – аммиак – глутамин – мочевина – гепатит

Յետազոտվել է բրոնիկ տետրախլորմեթան հեպատիտի ազդեցությունը առնետների փայծաղում ազոտի նյութափոխանակության վրա: Յետազոտություններով պարզվել է, որ փայծաղում բրոնիկ CCl_4 -հեպատիտի զարգացման ընթացքում տեղի է ունենում ամոնիակի պաթոլոգիկ կուտակում՝ զարկերակային հիպերամոնեմիայի զարգացման ֆոնի վրա: Ընդ որում, սպլենոցիտները ընդունակ չեն կանխել իրենց մեջ՝ գլուտամինի ձևավորման միջոցով ամոնիակի կուտակումը, որը թափանցում է զարկերակային արյունից և ձևավորվում իրենց մեջ ներթափանցող ակտիվացման արդյունքում: CCl_4 -ով օրգանիզմի բրոնիկ թունավորման ժամանակ, փայծաղը ձեռք է բերում զարկերակային արյունից ազատ միզանյութի «ակտիվ» կլանման ունակություն՝ հետագայում այն վերափոխելու կապված ձևի, իսկ օրգանիզմի վրա թունավոր ազդեցության ավարտից հետո՝ ունակություն ձևավորելու միզանյութ փայծաղի մակրոֆագերի միջոցով, ինչը չի խոչընդոտում ամոնիակի կուտակումը փայծաղի միջոցով:

Փայծաղ – ամոնիակ – գլուտամին – միզանյութ – հեպատիտ

The effect of chronic tetrahlometanic hepatitis on nitrogen metabolism in the rat spleen has been investigated. Studies have found that in the process of developing chronic CCl_4 -hepatitis in the spleen the abnormal accumulation of ammonia in the background of arterial hyperammonemia occurs. Thus, splenocytes are not capable to prevent the accumulation of ammonia via formation of glutamine which penetrates through the erterial blood and leads to activation of intracellular ammoniogeneza therein. In the course of chronic poisoning organism by CCl_4 the spleen acquires the ability to "active" free urea uptake of arterial blood, with the further transfer it into a coherent form, and after the termination of the toxic effects on the body and increase the formation of urea splenic macrophages, which does not prevent the accumulation of ammonia spleen.

Spleen – ammonia – glutamine – urea – hepatitis

В настоящее время установлено, что одним из органов, принимающих активное участие в хронизации воспалительного процесса в печени, является селезёнка [26]. В частности установлена её способность продуцировать аутоантитела к печёночным антигенам в ответ на воздействие тетрахлорметана (CCl_4) [27]. При этом главной мишенью селезёночных антител при хроническом CCl_4 -гепатите становятся митохондрии гепатоцитов [24]. Неслучайно спленэктомия при CCl_4 -поражении abortирует образование аутоантител к клеткам печени [26]. Вместе с тем при хроническом CCl_4 -гепатите спленоциты начинают выделять факторы, стимулирующие синтез ДНК в гепатоцитах, а также в клетках ретикулоэндотелиальной системы, находящихся в печени [15], принимая участие в регенерации поражённого органа [13]. Следует отметить, что 90 % клеток печени на высоте репаративной активности включают в свой хромосомный набор хромосому T_6 спленоцитов донора [19]. Помимо участия в аутоиммунных процессах, селезёночные макрофаги в условиях хронического диффузного поражения печени берут на себя поглотительную функцию купферовских клеток, которая нарушается при данной патологии [23]. Но при этом увеличивается поступление из селезёнки в кровь свободного железа [5], которое является катализатором свободно-радикальных процессов [4]. Между тем изменение специализированных функций клетки невозможно без определённых перестроек её внутриклеточного метаболизма, изучение которого даст ключ к пониманию причин, лежащих в основе нарушения или быстрого истощения её специфической функции в условиях патологии. Не является исключением азотистый метаболизм спленоцитов как активный участник внепечёночных реакций компенсации нарушения аммиакобезвреживающей функции гепатоцитов, что обнаружено после резекции здоровой печени [11].

Целью настоящей работы явилось изучение азотистого метаболизма в селезёнке при хроническом CCl_4 -гепатите.

Материал и методика. Опыты проведены на 57 беспородных половозрелых белых крысах (самках) массой 180-220 г. Хронический гепатит воспроизводили путём подкожного введения 50 %-ного раствора CCl_4 на оливковом масле (0,1 мл/100 г массы) через сутки с двумя двухнедельными перерывами (между 6-7 и 13-14 инъекциями) [13]. На 65-е сут моделирования CCl_4 -гепатита сразу после последней инъекции токсина под эфирным наркозом делали лапаротомию для оценки состояния печени. Животные были разделены на 5 серий опытов: 1 серия – интактные животные (норма), 2 серия – животные, исследованные на 65-е сут введения CCl_4 (конец затравки), 3, 4, 5 серии – животные с хроническим CCl_4 -гепатитом, исследованные соответственно на 3-и, 7-е и 14-е сут после лапаротомии и отмены CCl_4 . Забой животных проводился на фоне этиминального наркоза (40 мг/кг массы). Для определения азотистых метаболитов ткань селезёнки замораживали в жидком азоте и растирали до порошка, который использовали для приготовления 10 %-ного гомогената в 60 %-ном растворе трихлоруксусной кислоты. Гомогенат экстрагировали на холоде в течение 30 мин, затем центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об/мин. Полученный супернатант использовали для определения аммиака, глутамина и мочевины. Артериальную кровь (АК) для исследования брали предварительно гепаринизированными инсулиновыми шприцами из аорты. Объектом исследования служила депротеинизированная плазма крови. Содержание аммиака в ткани селезёнки определяли микродиффузионным методом [14], в крови – фенилгипохлоридным методом [22]. Содержание глутамина в почках и крови определяли методом кислотного гидролиза [20], содержание мочевины в селезёнке и крови – диацетилмоноксимовым методом [25]. Содержание метаболитов в селезёнке выражали в ммоль/кг влажной ткани, в крови – в ммоль/л. Результаты обработаны статистически с учётом параметрического t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Длительное прерывистое действие на организм малых доз CCl_4 вызывало увеличение концентрации аммиака в АК. При этом арте-

риальная гипераммониемия сохранялась к 14-м сут после отмены токсина (табл.1). Одной из причин её развития является формирование при данной патологии портальной гипертензии [2, 19], что приводит к открытию portoкавальных анастомозов и сбросу богатой аммиаком крови воротной вены в центральный кровоток, минуя печень [8]. Другой причиной является нарушение при хроническом CCl₄-гепатите основных путей обезвреживания аммиака (образование глутамина и синтез мочевины) в самой печени [9, 10].

Таблица 1. Содержание азотистых метаболитов в селезёнке (ммоль/кг влажной ткани) и артериальной крови (ммоль/л) при хроническом CCl₄-гепатите, $M \pm m$

Метаболиты	Норма, n=15	65-сут введения CCl ₄ , конец затравки, n=10	Сутки после отмены CCl ₄ и лапаротомии		
			3 n=12	7 n=10	14 n=10
Селезёнка					
Аммиак	1,67 ± 0,12	2,91±0,15*	2,01±0,2 [▲]	2,98±0,25*	2,78±0,29*
Глутамин	2,17 ± 0,13	1,99±0,23	1,67 ± 0,14*	1,83±0,15	2,33±0,23
Мочевина	3,31 ± 0,16	3,96±0,25	5,19±0,37* [▲]	2,95 ± 0,08 [▲]	5,93±0,51* [▲]
Артериальная кровь					
Аммиак	0,098±0,006	0,186±0,008*	0,166±0,01*	0,145±0,011*	0,128±0,007* [▲]
Глутамин	0,710±0,021	0,585±0,023*	0,660±0,021	0,810±0,02* [▲]	0,785±0,044 [▲]
Мочевина	3,4 ± 0,12	7,11±0,36*	6,17±0,31*	4,17±0,18* [▲]	3,97±0,18* [▲]

* (p<0,05) – достоверность различий по сравнению с нормой; [▲](p<0,05) – достоверность различий по сравнению с концом затравки. n- число животных по сериям опытов

Несмотря на то что хронический CCl₄-гепатит вызывает стойкое нарушение глутаминообразовательной функции гепатоцитов [10], концентрация глутамина в АК снижалась (на 18 %) только в конце затравки (табл.1). Между тем на 3-и и 14-е сут после отмены CCl₄ она находилась в пределах нормы, а на 7-е сут даже превышала её на 13% (табл.1). Это позволяет говорить об активации внепечёночных механизмов образования глутамина, например, в результате образования глутамина нефроцитами с его дальнейшей инкрецией в кровоток [6]. В свою очередь, увеличение реабсорбции мочевины в почках, выявленное при хроническом CCl₄-гепатите [6], следует рассматривать как одну из причин увеличения её содержания в АК (табл.1), несмотря на выявленное при данной патологии [9, 10] нарушение мочевиносинтетической функции гепатоцитов.

Сопоставление прироста концентраций аммиака в селезёнке и АК при хроническом CCl₄-гепатите показало, что в конце затравки концентрация аммиака в АК превышала норму на 90%, тогда как в селезёнке на 74% (табл.1). Если учесть, что диффузия аммиака через биологические мембраны происходит по градиенту концентрации [3], а проницаемость гистогематического барьера во всех органах при CCl₄-гепатите увеличивается [7], то можно говорить о нейтрализации части “артериального” аммиака спленоцитами. На 3-и сут после отмены CCl₄ эта реакция усиливалась, что приводило к нормализации концентрации аммиака в селезёнке на фоне артериальной гипераммониемии (табл.1). Однако на 7-е и 14-е сут после отмены CCl₄ концентрация аммиака в селезёнке вновь увеличивалась, становясь соответственно на 78 % и 66 % выше нормы, тогда как в АК прирост содержания аммиака составлял 48 % и 31 % соответственно (табл.1). Такое несоответствие указывает на активацию в спленоцитах к 7-м сут после отмены CCl₄ внутриклеточного аммонийногенеза, которая сохраняется к 14-м сут восстановительного периода. Причиной этого, возможно, обнаруженное при хроническом CCl₄-гепатите [23] усиление поглощения и переработки селезёночными макрофагами патологических иммунных комплексов в ответ на торможение этого процесса в купферовских клетках печени [23].

Поскольку конечным этапом расщепления белков в клетке, как известно [3], является дезаминирование входящих в их состав аминокислот, то и повышенное дезаминирование будет детерминировать накопление аммиака спленоцитами на 7-е и 14-е сут после отмены CCl_4 .

Одной из универсальных реакций нейтрализации аммиака в клетке является образование глутамина. Как видно из табл.1, формирование артериальной гипоглутаминемии на 65-е сут введения CCl_4 не сопровождалось изменением концентрации глутамина в селезёнке, которая оставалась в пределах нормы. Это позволяет говорить об увеличении образования глутамина в спленоцитах, что можно рассматривать как одну из причин нормализации содержания аммиака в селезёнке на 3-и сут после отмены токсина. При этом снижение (на 23%) в этот период концентрации глутамина в спленоцитах, происходящее на фоне нормализации его содержания в АК, позволяет говорить о повышенном поступлении “селезёночного” глутамина в портальный кровоток (табл.1). В свою очередь отрицательная корреляция ($r = -0,83$, $p < 0,05$) между содержанием аммиака и глутамина в селезёнке, выявленная на 7-е сут после отмены CCl_4 , происходящая на фоне восстановления содержания в ней глутамина и накопления аммиака, свидетельствует о торможении образования глутамина спленоцитами к указанному сроку.

В отличие от глутамина, мочевины не расщепляется клетками соматических органов, но, как и аммиак [1], легко диффундирует через биологические мембраны по градиенту концентрации. Как показали исследования, на 65-е сут введения CCl_4 концентрация мочевины в АК превышала норму в 2 раза, тогда как в селезёнке её содержание оставалось в пределах нормы (табл.1). Причиной такого несоответствия является обнаруженная ранее [1] способность мочевины переходить из свободного в связанное (с белками, липидами и липопротеидами) состояние. Это отражается не только на проницаемости внутриклеточных мембран [18], но и на функциональном состоянии белков [4]. Нельзя исключить и транзит части “артериальной” мочевины через спленоциты в портальный кровоток, куда она поступает вместе с образованным ими глутамином. На правомочность такого предположения указывает формирование на 65-е сут введения CCl_4 положительной корреляционной связи ($r = 0,81$, $p < 0,05$) между концентрацией мочевины в АК и содержанием глутамина в селезёнке, происходящее на фоне изменений концентрации указанных метаболитов в спленоцитах и АК (табл.1).

Если на 3-и, 7-е и 14-е сут после отмены CCl_4 содержание мочевины в АК превышало норму соответственно на 83 %, 23 % и 17 %, то в селезёнке её повышенная концентрация сохранялась только на 3-и и 14-е сут исследования, превышая норму соответственно на 53 % и 73 % (табл.1). Сопоставление данных показывает, что характер нарушения кинетики мочевины в спленоцитах крыс после отмены CCl_4 не только зависит от сроков восстановительного периода, но и определяет кинетику в них других азотистых метаболитов. Так, отрицательная корреляция ($r = -0,87$, $p < 0,05$) между содержанием мочевины и аммиака в селезёнке, выявленная на 3-и сут после отмены CCl_4 , указывает на определённую связь между нормализацией в этот период содержания аммиака в спленоцитах и увеличением в мочеине. Однако связывание аммиака через синтез мочевины у млекопитающих возможно только в печени и тонком кишечнике, где имеется полный набор ферментов орнитинового цикла Кребса-Хенселяйта [3]. В селезёнке, помимо аргиназы, локализованной в селезёночных макрофагах [17], сведения о наличии других ферментов орнитинового цикла в доступной литературе отсутствуют. Поэтому в данном случае речь может идти о влиянии “артериальной” мочевины на нейтрализацию аммиака спленоцитами через образование в них глутамина.

Известно, что мочевины, связываясь с глутаматдегидрогеназой, катализирующей дезаминирование глутамата [3], снижает сродство фермента к данному метаболиту [28]. В результате создаются условия для накопления клеткой глутамата, являющегося, наряду с аммиаком, субстратом для образования глутамина [3]. Кажется вполне очевидным, что этот механизм принимает участие в нормализации содержания аммиака в селезёнке на 3-и сут после отмены токсина. В свою очередь нормализация на 7-е сут после отмены CCl_4 содержания мочевины в селезёнке при сохранении её повышенной концентрации в АК (табл.1) не исключает сохранения перехода в спленоцитах “артериальной” мочевины из свободного в связанное состояние. На 14-е сут восстановительного периода данный процесс, вероятно, прекращается, а в спленоцитах активируется образование собственной мочевины. В результате прирост её концентрации в селезёнке на 14-е сут после отмены CCl_4 в 4 раза превышает аналогичные изменения содержания метаболита в АК (табл.1).

Скорость образования мочевины находится в прямой зависимости от активности аргиназы [16], между тем в макрофагах повышение аргиназной активности сопряжено с увеличением их цитотоксичности [21]. Поэтому увеличение концентрации мочевины в селезёнке на 14-е сут после отмены CCl_4 может служить косвенным признаком увеличения функциональной активности селезёночных макрофагов в указанный период наблюдений.

Таким образом, в процессе развития хронического тетрахлорметанового гепатита селезёнка вовлекается во внепечёночные механизмы компенсации нарушения обезвреживания аммиака в печени. Это приводит к патологическому накоплению спленоцитами аммиака, что связано как с неспособностью спленоцитов нейтрализовать через образование глутамина аммиак, поступающий из АК, а также аммиак, образующийся в них при внутриклеточном аммонийногенезе. В процессе хронического отравления организма CCl_4 селезёнка приобретает способность к “активному” поглощению свободной мочевины из артериальной крови, с дальнейшим переводом её в связанную форму. После прекращения токсического влияния CCl_4 на организм наблюдается отсроченная (на 14-е сут) стимуляция образования мочевины в селезёнке, не предотвращающая накопление в ней аммиака.

Благодарность. Считаю своим долгом выразить глубокую признательность ведущему кафедрой нормальной физиологии Воронежской государственной медицинской академии им. Н.Н. Бурденко профессору Виктору Николаевичу Яковлеву за возможность проведения исследований в лаборатории его кафедры и ценные советы при обсуждении полученных результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гершеневич З.С., Кричевская А.А., Лукаш А.И. Мочевина в живых организмах. Ростов н/Д., Изд-во РГУ, 1970.
2. Ковальская К.С. Функциональная связь между нарушением гемодинамики и оттоком лимфы при отравлении четырёххлористым углеродом. Бюллетень эксперим. биологии и медицины. 11, 25-26, 1971.
3. Косенко Е.А., Каминский Ю.Г. Клеточные механизмы токсичности аммиака М., Изд-во ЛКИ, 2008.
4. Кричевская А.А., Лукаш А.И., Внуков В.В., Дудкин С.И. Железосодержащие белки плазмы крови и протеолитическая активность в сыворотке крови при гипербарической оксигенации и защитном действии мочевины. Биологические науки, 9, 30-36, 1986.
5. Мигина Т.В. Роль селезёнки в эндогенном обмене железа в условиях анемии и экспериментального гепатита. Патологическая физиология и экспериментальная терапия, 4, 53-56, 1963.

6. Молчанов Д.В. Кинетика азотистых метаболитов в почках при частичной гепатэктомии, хроническом гепатите и гипербарической оксигенации. Дисс. канд мед наук, ВГМА Воронеж, 2010
7. Нейко В.В. Влияние этимизола на проницаемость гематоцеллюлярного барьера при отравлении четырёххлористым углеродом, вызывающим гепатит. Бюллетень эксперим. биологии и медицины, 12, 700-701, 1980.
8. Решетняк В.И. Печёночно-клеточная недостаточность. Общая реаниматология, 3, 1, 68-79, 2005.
9. Савилов П.Н. Кровоток, напряжение кислорода и обезвреживание аммиака в печени при длительном действии на организм малых доз тетрахлорметана. В кн. „Экология и безопасность жизнедеятельности“. Воронеж, 74-79, 1996.
10. Савилов П.Н. Состояние аммиакобезвреживающей функции печени при хроническом активном гепатите. Патол. физиол. и эксперим. терапия, 1, 24-26, 2004.
11. Савилов П.Н. Азотистый метаболизм селезёнки при резекции печени и гипербарической оксигенации. Биол. журн. Армении, 66, 2, 6-17 2014.
12. Саркисов Д.С., Пальцев М.А., Хитров Н.К. Общая патология человека. М., Медицина, 1995.
13. Саркисов Д.С., Рубецкой Л.С. Пути восстановления цирротически изменённой печени. М., Медицина, 1965.
14. Слакова А.И., Трубин Г.П., Явлюкова А.И. Микрометод определения аммиака и глутамина в тканевых трихлоруксусных экстрактах Вопросы медицинской химии, 8, 5, 538-544, 1962.
15. Сукерник Р.И., Скворцова Т.А., Леонтьева Л.И., Ладыгин В.И. Воспроизведение клеточных аутоиммунных реакций к печени у мышей путём имплантации селезёночных клеток сингенных доноров с токсическим гепатитом. Цитология, 13, 5, 636-643, 1977.
16. Трапезникова С.С., Навасардянц А.Г., Давтян М.А. Множественные формы аргиназы печени крысы. Биохимия, 47, 2, 2022-2027, 1982.
17. Чернышёва М.Д., Малыгин А.М., Фель В.Я. Индукция аргиназной активности в спленоцитах мышей СЗНА при частичной гепатэктомии. Цитология, 27, 2, 209-212, 1985.
18. Чихачёв А.С. Действие гипербарической оксигенации (ГБО) на проницаемость мембран лизосом мозга и защитный эффект мочевины. В кн. „Новое в диагностике, лечении и профилактике заболеваний“, Ростов-н/Д., 53-54, 1974.
19. Hard R.C., Kulgren B. Chimeric mice with donortype liver cells Sciens, 152, 349-352, 1966.
20. Harris M. Studies regenerating a glutamine-like substance in blood and spinal fluid, including a method for its quantitative determination. J. Clin. Invest., 22, 4, 569-576, 1943.
21. Jakway J.P., Morris H.G. Blumental E.J., Talmage D.W. Serum factors required for arginase induction in macrophages Cell. Immunol., 54, 253-264, 1980.
22. Keller H., Muller-Beisenritz, M., Neumann E. Eine Methode zur Ammoniakbestimmung in Capillarblut Klin. Wsch., 15, 314-319, 1967.
23. Noda T, Mimura H., Orito K. Assesement of Kupfer cell function in rats with chronic liver injury caused by CCl₄. Hepatogastroenterology, 3, 3, 319-323, 1990.
24. Pincard R.N., Weir D.M. Antibodies against mitochondrial fraction of lever after toxic liver damage rats. Clin.Exper. Immunol., 1, 33-43, 1966.
25. Richterrich D. Clinical. Chemistry -N.Y., Academia Press, 1962.
26. Weir D.M. Liver autoantibodies in the rat Immunology, 6, 581-591, 1963.
27. Weir D.M, Sveling D.E. Immunocytoadherence by spleen cells and carbon tetrachloride rats Clin.Exper. Immunol., 3, 837-841, 1968.
28. Yancey P.H., Somero G.H. Methylamine osmoregulatory solubes of elasmobranch fishes con-teract urea inhibition of enzymes. J. Exp. Zool., 213, 2, 205-213, 1980.

Поступила 16.02.2015



Биол. журн. Армении, 2 (67), 2015

ГАСТЕРОИДНЫЕ БАЗИДИОМИЦЕТЫ ШИКАОХСКОГО ЗАПОВЕДНИКА

Л.В. МАРКАРЯН

Ереванский госуниверситет, кафедра ботаники и микологии
lusinemargaryan@ysu.am

В работе приведены данные о видовом составе гастероидных базидиомицетов Шикаохского государственного заповедника. Выявлено 18 видов грибов, из которых 4 вида ранее не отмечались на территории заповедника, а 3 вида и 1 род являются новыми для Армении.

*Шикаохский государственный заповедник –
гастероидные базидиомицеты – идентификация*

Աշխատանքում ներկայացված են տվյալներ Շիկահող պետական արգելոցի գաստերոիդ բազիդիոմիցետների տեսակային կազմի մասին: Բացահայտվել է սնկերի 18 տեսակ, որոնցից 4 մինչ այդ հայտնաբերված չէին արգելոցի տարածքում, իսկ 3 տեսակ և 1 ցեղ Հայաստանի համար գրանցվել են առաջին անգամ:

Շիկահող պետական արգելոց – գաստերոիդ բազիդիոմիցետներ – նույնականացում

In the work data of species composition of gasteroid basidiomycetes of Shikahogh State Reserve are presented. 18 species of fungi were identified, of which 4 species were not observed in the reserve previously, and 3 species and 1 genus are registered in Armenia for the first time.

Shikahogh State Reserve – gasteroid basidiomycetes – identification

Биологическое разнообразие мира – это мощный источник ресурсов. Оно охватывает все формы жизни – от крошечных микроорганизмов до крупных животных и экосистемы, к которым они принадлежат. В результате деятельности человека экосистемы деградируют, разрушаются естественные места обитаний, а виды вымирают или сокращается их численность. В связи с этим идентификация и мониторинг биоразнообразия с целью сохранения отдельных регионов, в том числе особо охраняемых территорий, являются первоочередной задачей и залогом устойчивого развития человечества [1].

Армения имеет богатое биоразнообразие, что связано с разнообразием климатических условий, почвенным и растительным покровом. Для решения многих экологических проблем и с целью сохранения и изучения биоразнообразия нашей планеты были созданы особо охраняемые природные территории (ООПТ). Сохранение биоразнообразия *in situ* наиболее эффективно проводится именно на этих территориях. Первая система ООПТ Армении начала формироваться с 1958 года, когда были созданы “Хосровский лес”, “Дилижанский” и “Шикаохский” заповедники и отдельные заказники [7].

Шикаохский заповедник располагается в юго-восточной части Сюникского марза в бассейнах рек Цав и Шикаох на северном макросклоне Мегринского хребта на высоте 700-2400м над уровнем моря. В заповеднике основными объектами охраны являются лиственные, в частности дубовые, грабовые и дубово-грабовые леса, а также участки с наиболее интересными и редкими растительными сообществами [3].

Для некоторых регионов Армении данные о видовом составе грибов носят отрывочный характер. Объясняется это [2] частично отсутствием планомерных исследований микобиоты отдельных труднодоступных территорий, а также тем обстоятельством, что появление карпофоров макрогрибов в основном лимитируется выпадением осадков, которые носят сезонный характер.

В данной работе представлены результаты специальных исследований гастероидных базидиомицетов Шикаохского заповедника, который по сравнению с другими особо охраняемыми природными территориями в микологическом аспекте недостаточно изучен.

Материал и методика. Объектом исследований послужили как собственные сборы гастероидных базидиомицетов Шикаохского заповедника, так и материал, хранящийся в гербарии кафедры ботаники и микологии Ереванского государственного университета (ERHM).

Сбор макрогрибов осуществлялся маршрутно-экспедиционным методом в течение 2009-2014 гг. Камеральная обработка гербарного материала проводилась по общепринятой методике микологических исследований [5, 16]. Во время определения видовой принадлежности исследуемых грибов использовались многочисленные монографии, определители и атласы [10, 12, 13, 17]. За основу распределения приведенных грибов по таксономическим группам принята система, приведенная в X томе словаря Эйнсворта и Бисби [15], с некоторыми изменениями согласно данным интернет – ресурсов Index Fungorum [19, 20].

Результаты и обсуждение. Гастероидные базидиомицеты в систематическом отношении представляют собой довольно сложную группу базидиальных грибов, характеризующихся наличием ангиокарпных плодовых тел, в которых образуются базидии с базидиоспорами. У гастеромицетов различаются виды с подземными, полуподземными и надземными карпофорами. Чаше встречаются виды с надземными сидячими или снабженными ножкой плодовыми телами. У некоторых представителей образуется особый плодоносец-рецептакул, на котором располагается плодоносный слой [10]. Гастероидные грибы встречаются в самых разных экосистемах, во всех климатических зонах земного шара. Они имеют важное значение в жизни биогеоценозов, т.к. способствуют частичной минерализации растительных остатков. По сравнению с другими макромицетами эта группа грибов относительно мало изучена во всем мире.

Систематическое положение гастеромицетов, признание их самостоятельной группой базидиальных грибов до настоящего времени остается спорным. Еще в конце прошлого столетия некоторые авторы отмечали, что причиной повышенного интереса к филогении Agaricales, Gasteromycetes является широкий спектр форм обеих групп, который дает возможность сравнения и выявления сходства и различия [6]. Авторы поддерживали гипотезу гастрального происхождения агарикальных грибов ввиду того, что к настоящему времени гастральные предки установлены для всех семейств трубчатых и пластинчатых грибов. Не было единого мнения о направлениях эволюции этих групп грибов [9]. Внедрение молекулярных методов в систематику, а также анализ эволюционных связей грибов и их классификации, основанные на молекулярно-генетических исследованиях, с конца прошлого столетия привели к пере-

смотрю объемов таксономических групп. В результате потеряли свой таксономический статус такие классы грибов, как Homobasidiomycetes, Gasteromycetes, порядок Aphyllophorales [4, 8, 11, 14, 18].

В результате исследования видового состава гастероидных базидиомицетов Шикаохского заповедника, на основе собственного материала, пересмотра гербарных образцов и обработки литературных данных выявлено 18 видов грибов. Данные табл. 1 свидетельствуют о том, что обнаруженные грибы представлены одним классом Agaricomycetes, 3 порядками, 4 семействами, 8 родами.

Таблица 1. Количественное распределение видов гастероидных базидиомицетов по таксонам

Класс/порядок	Семейство	Род	Вид
Agaricomycetes Agaricales	Agaricaceae	<i>Bovista</i>	<i>B. nigrescens</i>
			<i>B. plumbea</i>
		<i>Calvatia</i>	<i>C. craniiformis</i>
		<i>Lycoperdon</i>	<i>L. echinatum</i>
			<i>L. pusillum</i>
			<i>L. pyriforme</i>
			<i>L. perlatum</i>
			<i>L. spadiceum</i>
			<i>L. umbrinum</i>
		<i>Vascellum</i>	<i>V. pratense</i>
Boletales	Phelloriniaceae	<i>Phellorinia</i> *	<i>Ph. herculeana</i> *
	Sclerodermataceae	<i>Scleroderma</i>	<i>S. bovista</i>
			<i>S. verrucosum</i>
			<i>S. aerolatum</i> *
Geastrales	Geastraceae	<i>Geastrum</i>	<i>G. indicum</i> **
			<i>G. triplex</i> *
			<i>G. fimbriatum</i> **
		<i>Sphaerobolus</i>	<i>S. stellatus</i>
Итого: 1/3	4	8	18

* - в таблице обозначены новые виды для Шикаохского заповедника.

** - в таблице обозначены новые виды и роды для Армении.

По видовому разнообразию ведущим порядком является порядок Agaricales, который представлен 2 семействами Agaricaceae и Phelloriniaceae. Первое место в порядке Agaricales по количеству видов занимает семейство Agaricaceae с 10 видами и 4 родами. Семейство Phelloriniaceae представлено одним родом и одним видом, причем как род *Phellorinia*, так и вид *Ph. herculeana* отмечаются в Армении впервые.

В количественном отношении второе место занимает порядок Geastrales, который включает одно семейство, 2 рода и 4 вида, из которых 3 вида грибов (*G. indicum*, *G. triplex*, *G. fimbriatum*) являются новыми для Шикаохского заповедника и один вид (*G. triplex*) – для Армении.

По количеству семейств и родов самым малочисленным является порядок Boletales с 1 семейством, 1 родом и 3 видами. Из обнаруженных 3 видов как для Шикаохского заповедника, так и для Армении один вид (*S. aerolatum*) отмечается впервые.

Таким образом, в результате таксономического анализа гастероидных базидиомицетов Шикаохского заповедника было выявлено 18 видов, которые можно отнести к формально редким видам, т.к. большинство из них представлены единичными находками. Среди обнаруженных грибов 5 видов ранее не отмечались на территории заповедника, а 3 вида и 1 род являются новыми для Армении.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Госкомитета по науке Министерства высшего образования Армении (грант N 13-IF 183).

ЛИТЕРАТУРА

1. Բնապահպանության նախարարություն /Առաջարկություններ Հայաստանի Հանրապետության բնության հատուկ պահպանվող տարածքների զարգացման նոր պետական ռազմավարության եվ գործողությունների ազգային ծրագրի վերաբերյալ. ՄԱԿ-ի զարգացման ծրագիր/Գլոբալ էկոլոգիական հիմնադրամ, Երևան, 79 էջ, 2010:
2. ՀՀ «Կենսաբանական բազմազանության մասին» կոնվենցիա V ազգային զեկույց. 126 էջ, 2014:
3. Փալսոյան Ս., Ոսկանյան Գ. Հայաստանի հատուկ պահպանվող տարածքները և անտառները . WWF-Հայաստան, 52 էջ, 2012:
4. Бондарцева М.А. Определитель грибов СССР. Порядок Афиллофоровые, вып. 2, СПб, Наука. 391 с., 1998.
5. Вассер С.П. Флора грибов Украины. Агариковые грибы. Киев, Наукова думка, 328 с., 1980.
6. Дудка И.А., Вассер С.П. Грибы. Справочник миколога и грибника. Киев, Наукова думка, 535 с., 1987.
7. Заповедники СССР. Заповедники Кавказа /Под общ. ред. В.Е. Соколова, Е.Е. Сыроечковского. М., Мысль, 365 с., 1990.
8. Кусакин О.Г., Дроздов А.Л. Филема органического мира. СПб., Наука, 381 с., 1997.
9. Нанагюлян С.Г. Макромицеты республики Армения. Диссертация на соиск. уч. степ. доктора биол. наук. Ереван, 412 с., 1997.
10. Нанагюлян С.Г., Осипян Л.Л. Конспект макроскопических грибов Армении. Гастеромицеты. Ереван, Изд. НАН РА, 52 с., 2000.
11. Сидорова И.И. Макросистема грибов: методология и изменения последнего десятилетия. В кн.: Новое в систематике и номенклатуре грибов. Москва, с. 7-71, 2003.
12. Сосин П.Е. Определитель гастеромицетов СССР. Л., Наука, 163 с., 1973.
13. Cejp K., Moravec Z., Pilát A., Pouzar Z., Stanek V.J., Svrcek M., Sebek S., Smarda F. Flora CSR. Houby (Gasteromycetes). Praha, Nakl-vo CSAV, 827 s., 1958.
14. Hibbet D.S., Binder M., Bischoff J.F. et al. A higher level phylogenetic classification of fungi. Mycol. Res., III, p. 509-547, 2007.
15. Kirk P.M., Cannon P.F., Minter D.W., Stalpers, J.A. ed. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. 10th edition. CABI Publishing, 771 p., 2008.
16. Mueller G.M., Bills G.F., Foster M.S. Biodiversity of fungi. Inventory and monitoring methods. London, Elsevier Academic press., 777 p., 2004.
17. Miller O.K., Miller H.H. North American Mushrooms. Connecticut, An imprint of the Globe Pequot press., 584 p., 2006.
18. Shnyreva A.V. Molecular systematics and species concept in fungi: approaches and resolutions. Mikologia i fitopatologia, 45, 3, p. 209-220, 2011.
19. indexfungorum.org
20. mycobank.org

Поступила 04.03.2015



Biolog. Journal of Armenia, 2 (67), 2015

AGE-DEPENDENT DIFFERENCE IN THYMOCYTE POLY(ADP-RIBOSE) POLYMERASE 1 INHIBITION AFTER THE IN VIVO TREATMENT OF RATS WITH CISPLATIN

I.G. ARTSRUNI, A.L. ASATRYAN, K.S. MATINYAN, E.S. GEVORGYAN

Yerevan State University, Department of Biophysics
gana@ysu.am

Immunosuppression is the most common toxic side-effect elicited by treatment with cisplatin. To improve cytotoxic effect of cisplatin, nowadays poly(ADP-ribose)polymerase 1 (PARP 1) inhibitors are employed in cancer treatment. Driven with the knowledge that age-related thymic involution is a part of immune system degeneration, the enzyme inhibition in thymocyte nuclei of different age rats treated with cisplatin had no appreciable effect on pubertal age (4 week old) male thymocyte, whilst elicited elevation of PARP 1 activity by 40% in female counterparts. Administration of cisplatin to young adult females (10 week old) enhanced PARP-1 activity nearly by 60%. It was revealed that administration of cisplatin to rats displayed age-dependent modulation in PARP 1 inhibition by benzamide and ATP in thymocyte. The data presented herein demonstrate that treatment with cisplatin can modulate efficiency of PARP 1 inhibitors in age- and sex-dependent manner.

Cisplatin treatment – PARP 1 inhibition – thymocyte – age-dependent difference

Իմունային համակարգի ընկճումը ցիսպլատինի տոքսիկ ազդեցության ամենահաճախ հանդիպող դրսևորումներից է: Ներկայումս չարորակ նորագոյացությունների բուժման ընթացքում ցիսպլատինի ցիտոտոքսիկ ազդեցության արդյունավետությունը մեծացնելու նպատակով կիրառվում են պոլի(ԱԿՖ-ռիբոզ)պոլիմերազ 1-ի (ՊԱՌՊ 1) արգելակիչներ: Ելնելով նրանից, որ ուրցագեղձի հասակային հետաճը իմունային համակարգի հետադիմության մասն է, մենք հետազոտել ենք ցիսպլատինի ազդեցությունը ֆերմենտի ակտիվության արգելակման վրա տարբեր հասակի առնետների թիմոցիտների կորիզներում:

Տվյալ աշխատանքում ներկայացված հետազոտությունների արդյունքները ցույց են տալիս, որ ցիսպլատինը չի ազդում դեռատի (4 շաբաթական) արու առնետների թիմոցիտների ՊԱՌՊ 1 ակտիվության վրա, մինչդեռ ավելի քան 40 % խթանում է ֆերմենտի ակտիվությունը եգ առնետների թիմոցիտներում: Ցիսպլատինի խթանիչ ազդեցությունը ավելի ուժեղ է դրսևորվում երիտասարդ հասուն (10 շաբաթական) եգ առնետների թիմոցիտներում (մոտ 60%-ով): Ներկայացված արդյունքները վկայում են, որ ՊԱՌՊ 1 արգելակիչների արդյունավետությունը ցիսպլատինի ներգործությունից հետո կախված է առնետների հասակից և սեռից:

Ցիսպլատինի ներգործություն – ՊԱՌՊ 1 արգելակում – թիմոցիտներ – հասակային տարբերություններ

Иммуносупрессия является наиболее часто наблюдаемым токсическим побочным действием цисплатина. Для усиления цитотоксического действия самого цисплатина при лечении онкологических заболеваний в настоящее время применяют ингибиторы поли(АДФ-рибозо)полимеразы 1 (ПАРП 1). Исходя из того, что возрастная инволюция тимуса является частью дегенерации иммунной системы, в данной работе мы исследовали действие цисплатина на эффективность ингибиции фермента в ядрах тимоцитов крыс различного возраста. Представленные в настоящей работе результаты свидетельствуют о том, что цисплатин не имеет заметного действия на активность ПАРП 1 ядер тимоцитов самцов подростко-

вого возраста (4 недели), в то время как активность фермента в тимоцитах самок увеличивается на 40%. В тимоцитах молодых взрослых самок (10 недель) цисплатин вызывает большую активацию фермента (около 60%). Показано, что инъекция цисплатина влияет на эффективность ингибции ПАРП 1 бензамидом и АТФ. Результаты, представленные в настоящей работе, указывают на то, что действие цисплатина на эффективность ингибции ПАРП 1 в тимоцитах зависит от возраста и пола крыс.

Действие цисплатина – ингибирование ПАРП 1 – тимоциты – возрастные различия

Thymus is responsible for differentiation and production of immunocompetent thymocytes, playing a crucial role in generation of proper immunological defense in vertebrates. However, this organ undergoes decrease in size along with life span and this is termed as age-related thymic involution. Amounting evidence come to show that age-dependent thymic involution manifest sexual dimorphism [5]. To generate effective immune response and improve therapeutic outcomes in treatment of many diseases age and sex-related peculiarities should be considered. It is recognized that regulation of immune mechanisms that are responsible for inflammatory reactions depends on poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP 1). PARP 1 is abundant chromatin associated enzyme involved in DNA repair, maintenance of genomic stability, transcription control, cell death and proliferation [1]. Binding of PARP 1 at DNA breaks or regions comprising altered DNA conformation [15] activates the enzyme to create linear or branched polymers of ADP-ribose attached to PARP 1 itself and chromatin proteins at the vicinity of enzyme localization, marking the point to the repair machinery [8]. Nowadays, PARP 1 inhibitors are entering clinical trials to improve curative potential of DNA damaging agents in cancer chemotherapy and benefits therapeutic outcomes in ischemic insults treatment [2, 4].

Driven by the fact that thymus undergo age-related involution, which accelerates when rodents proceed from pubertal age to adulthood, the PARP 1 activity and inhibition in thymocytes after treatment of pubertal age (4 week old) and young adult (10 week old) rats with cisplatin were studied herein.

Materials and methods. All reagents were purchased from Sigma.

Albino inbred male and female rats (4 week and 10 week old) were used throughout experiments. Cisplatin was injected abdominal (10mg/1000g wt). Animals were killed in 48 h under light ether anesthesia by decapitation. Nuclei were isolated according to Hewish and Burgoyne [6]. All sucrose solutions utilized throughout liver nuclei isolation procedures were buffered with 20 mM Tris containing 15 mM NaCl, 60 mM KCl, 0,15 mM spermine, and 0,5mM spermidine at pH 7,4.

The enzymatic assay for PARP 1 activity relies on chemical quantitation of NAD^+ in PARP assay buffer [14]. The assay was adapted to quantification of NAD^+ consumed by isolated nuclei.

Briefly, nuclei gently resuspend in 900 μl PARP assay buffer (20 mM Tris, 6mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , at pH 7.4). PARP reaction was initiated by addition of NAD^+ stock solution to nuclear suspension in PARP assay buffer to 0,5 mM NAD^+ final concentration. The reaction proceeded for 10 min (37°C) and was stopped by removal of nuclei from reaction mixture by centrifugation at 13 000 g for 2 min. The supernatants were transferred to the wells of Nunc plane-bottom 96-well plate. NAD^+ quantification was performed in 50 μl of supernatant probes by sequential addition of 2 M KOH and 20% acetophenone (in EtOH), yielding final concentrations of KOH, acetophenone and formic acid in accordance with original assay. The absorbance of PARP assay buffer containing 0.5 mM NAD^+ was determined at 378 nm alongside the samples derived from nuclear suspensions and was set as standard. The amount of NAD^+ present in samples of nuclear suspensions in PARP assay buffer was determined by subtraction of test sample absorbance from the standard.

Results and Discussion. It is well recognized that age-related thymic involution is responsible for greater susceptibility to infections in aging organisms [12]. On the other hand, immunosuppression is the most common toxic side-effect elicited by treatment with cisplatin. Thus, the impact of cisplatin on PARP 1 activity of the cells which constitute the first line in immune defense e.g. thymocytes, derived from the glands of rats of different age and sex was examined in this study. It was reported previously that resistance of cancer cells to cisplatin is associated with PARP1 hyperactivation which predicts therapeutic benefits of pharmacologic interventions with PARP 1 inhibitors [11]. However, little is known about the impact of cisplatin administration on PARP1 activity and kinetics of enzyme inhibition by PARP 1 with pharmacologic inhibitors in context of drug-drug interaction. Taking into account age-dependent modulations in PARP 1 activity in peripheral blood lymphocytes [10], we were interested to examine impact of the *in vivo* treatment with cisplatin on PARP 1 inhibition in thymocyte nuclei by benzamide and allosteric inhibitor ATP after administration of drug to rats of different age. Benzamide is well recognized NAD⁺-competing inhibitor of first generation and ample of its derivatives nowadays are employed in clinical trials [3]. It was shown, that ATP binds to autoribosylation domain of PARP 1, thereby influencing DNA-binding route of enzyme control *in vitro* and thus, is recognized as PARP 1 allosteric inhibitor [9]. Coming from this, and to discriminate non-specific effects which arise from Bam impact on glucose metabolism, DNA synthesis and cell viability from kinetic inhibition of PARP 1, we examine PARP 1 inhibition in isolated thymocyte nuclei [13].

In vivo treatment with cisplatin had no appreciable effect on pubertal age (4 week) male thymocyte, whilst elicited elevation of PARP 1 activity by 40% in female counterparts. Administration of cisplatin to young adult females caused more significant PARP 1 activation in thymocyte (nearly by 60%) (fig1).

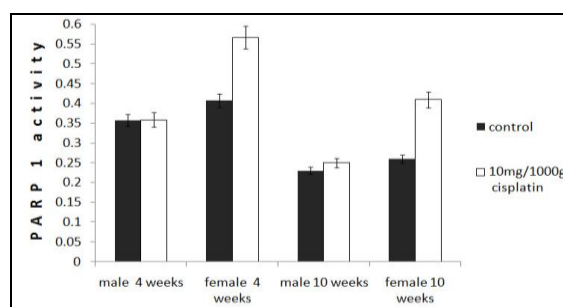


Fig. 1. PARP 1 activity in thymocyte nuclei of rats treated with cisplatin. $p < 0.05$

In general, these results come to show that female thymocyte in regard to PARP 1 activity modulation is more susceptible to chemical insult exerted by intervention with cisplatin.

Our data show that PARP 1 inhibition by Bam depends on age and is more effective in thymocyte of 10 week old rats (fig.2, 3).

The results show that there was no difference in PARP 1 inhibition by 1 mM ATP in thymocytes of cisplatin treated 4 week old rats (fig 4, 5). However, thymocytes from 10 week old rats exhibited elevated susceptibility to inhibition by ATP. It was revealed that inhibitory efficiency of 1 mM ATP significantly increased (fig. 6).

The data presented herein demonstrate that treatment with cisplatin can modulate efficiency of the PARP 1 inhibitors in age-dependent manner and in general they are in good agreement with results reported earlier by other authors demonstrating that efficiency of PARP 1 inhibition depends on initial activity of the enzyme [7].

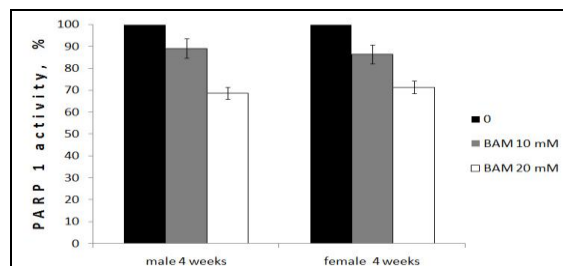


Fig. 2. Inhibition of PARP 1 by Bam in thymocyte nuclei of pubertal age rats injected with cisplatin. Nuclei were isolated in 48 h drug treatment. Bam was added into nuclei incubation media. $p < 0.05$.

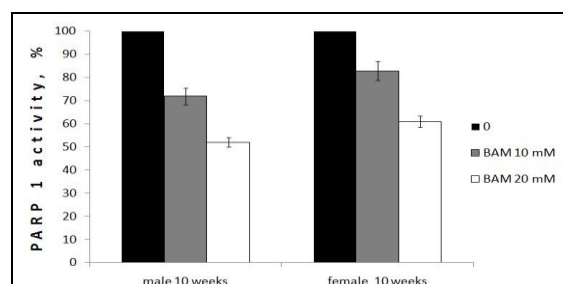


Fig. 3. Inhibition of PARP 1 by Bam in thymocyte nuclei of young adult rats injected with cisplatin. Nuclei were isolated in 48 h drug treatment. Bam was added into nuclei incubation media. $p < 0.05$.

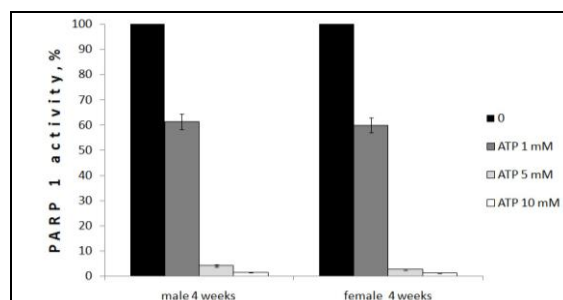


Fig. 4. PARP 1 inhibition by ATP in thymocyte nuclei isolated from pubertal age rats after treatment with cisplatin. $p < 0.05$.

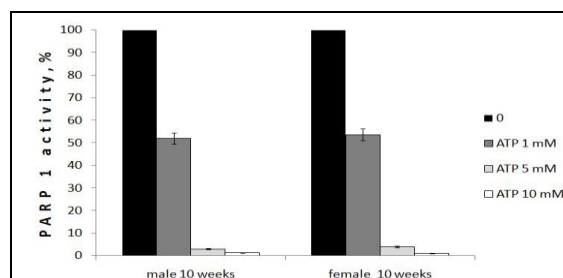


Fig.5. PARP 1 inhibition by ATP in thymocyte nuclei isolated from young adult rats treated with cisplatin. $p < 0.05$.

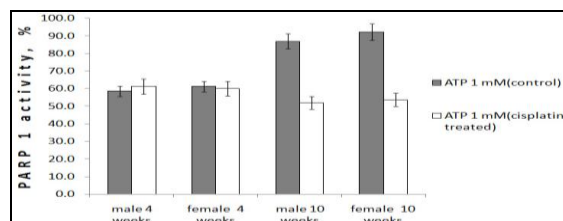


Fig.5. PARP 1 inhibition by 1 mM ATP in thymocyte nuclei isolated from different age rats of control and cisplatin treated groups. $p < 0.05$.

Coming from aforementioned, we suggest that age-dependent difference in PARP 1 inhibition after intervention with cisplatin should be considered while designing chemotherapeutic regimen for cancer treatment.

This work was made possible in part by research grant from the Armenian National Science and Education Fund (ANSEF) based in New York, USA

REFERENCES

1. Beneke S. Regulation of chromatin structure by poly(ADP-ribosyl)ation, *Frontiers in genetic*, 3, p. 169, 2012.
2. Clark C.C., Weitzel J.N., O'Connor T.R. Enhancement of synthetic lethality via combinations of ABT-888, a PARP inhibitor, and carboplatin in vitro and in vivo using BRCA1 and BRCA2 isogenic models. *Mol. Cancer Ther.*, 11, p. 1948-58, 2012.
3. Davar D., Beumer J.H., Hamieh L., Tawbi H. Role of PARP Inhibitors in Cancer Biology and Therapy, *Curr. Med. Chem.*, 23,19, p. 3907-3921, August 1, 2012.
4. Delaney C.A., Wang L.Z., Kyle S., White A.W., Calvert A.H., Curtin N.J., et al. Potentiation of temozolomide and topotecan growth inhibition and cytotoxicity by novel poly(adenosine diphosphoribose) polymerase inhibitors in a panel of human tumor cell lines. *Clin. Cancer Res.*, 6, p.2860-7, 2000.
5. Gui J., Mustachio L.S., Dong-Ming Su, Ruth W. Craig. Thymus Size and Age-related Thymic Involution: Early Programming, Sexual Dimorphism, Progenitors and Stroma, *Aging and disease*, 3, 3,p. 280-290, 2012.
6. Hewish D.R., Burgoyne L.A. The calcium dependent endonuclease activity of isolated nuclear preparations. Relationships between its occurrence and the occurrence of other classes of enzymes found in nuclear preparations. *Biochem. Biophys. Res. Com*, 52, p. 475-481, 1973.
7. J. Murai, Shar-yin N. Huang,B.B. Das, A. Renaud, Y. Zhang, J. H. Doroshow, J. Ji, Sh. Taeda, Y. Pommier. Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors. *Cancer Res.*, 72, 21, p. 5588-5599, November 1, 2012.
8. Krishnakumar, W.L.Kraus The PARP Side of the Nucleus: Molecular actions. Physiological Outcomes, and Clinical Targets. *Mol. Cell*, 39, July 9,8-24, 2010,
9. Kun E., Kirsten E., Mendeleyev J., Ordahl Ch.P. Regulation of the Enzymatic Catalysis of Poly(ADP-ribose) Polymerase by dsDNA, Polyamines, Mg^{2+} , Ca^{2+} , Histones H1 and H3, and ATP. *Biochemistry*, 43, p. 210-216, 2004.
10. Mangerich A., Burke A. Pleiotropic Cellular Functions of PARP1 in Longevity and Aging: Genome Maintenance Meets Inflammation, *Oxidative Med. and Cellular Longevity*, 2012, p. 1-19, 2012.
11. Michel et al; Cisplatin Resistance Associated with PARP Hyperactivation, *Cancer Res.*, 73, 7, p. 2271-80, 2013.
12. Nikolich-Zugich J. Ageing and life-long maintenance of T-cell subsets in the face of latent persistent infections. *Nat. Rev. Immunol.*, 8, p. 512-522, 2008.
13. Peralta-Leal A.;Rodríguez-Vargas J., Aguilar-Quesada R., Rodríguez M. I.,Linares J.L., de Almodóvar M. R., Oliver F. J PARP inhibitors: New partners in the therapy of cancer and inflammatory diseases, *Free Radic.Biol. Med.*, 47, 1, p. 13-26, 2009.
14. Putt K.S. and Hergenrother P.J. An enzymatic assay for poly(ADP - ribose) polymerase 1 (PARP 1) via the chemical quantitation of NAD^+ : application to the high-throughput screening of small molecules as potential inhibitors. *Analytical Biochemistry*, 326, p.78-86, 2004.
15. Wacker D.A., Ruhl D.D., E.H. Balagamwala, K.M. Hope,T. Zhang, W. Lee Kraus. The DNA Binding and Catalytic Domains of Poly(ADP-Ribose)Polymerase 1 Cooperate in the Regulation of Chromatin Structure and Transcription. *Molecular And Cellular Biology*, 27, p. 7475-7485, 2007.

Received on 26.03.2015



Биол. журн. Армении, 2 (67), 2015

ПОЛУЧЕНИЕ ФРУКТООЛИГОСАХАРИДОВ ИЗ КРАХМАЛА И ИНУЛИНА С ПРИМЕНЕНИЕМ ЦИКЛОДЕКСТРИНГЛЮКОЗИЛТРАНСФЕРАЗЫ И ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ИНУЛИНАЗЫ

А.М. БАЛАЯН¹, Л.С. МАНУКЯН¹, В.Т. КОЧИКЯН¹, К.Б. АФЯН¹,
Н.А. АНДРЕАСЯН¹, В.А. АБЕЛЯН², Э.Г. АФРИКЯН¹

¹НПЦ „Армбиотехнология“, НАН РА
balayan49@yandex.com

²PureCircle Ltd, Negeri Sembilan, Malaysia
microbio@sci.am

Изучены некоторые свойства иммобилизованной инулиназы в условиях высокой концентрации субстрата с целью получения фруктоолигосахаридов из крахмала и инулина. С использованием циклодекстринглюкозилтрансферазы (ЦГТаза, ЕС 2.4.1.19) и иммобилизованной инулиназы (2,1-β-D-фруктан-фруктаногидролаза, ЕС 3.2.1.7) получена смесь фруктоолигосахаридов с конечным СВ=76%. С помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и тонкослойной хроматографии (ТХ) определен состав полученных олигосахаридов.

Иммобилизованные ферменты – крахмал – инулин – фруктоолигосахариды

Ուսումնասիրվել են իմոբիլիզացված ինուլինազի որոշ հատկություններ սուբստրատի բարձր կոնցենտրացիայի պայմաններում՝ օսլայից և ինուլինից ֆրոկտոոլիգոզաքարների ստացման նպատակով: Ֆիկլոդեքստրինգլյուկոզիլտրանսֆերազի (ՑԳՏազ, ЕС 2.4.1.19) և իմոբիլիզացված ինուլինազի (2,1-β-D-ֆրոկտան-ֆրոկտանոհիդրոլազ, ЕС 3.2.1.7) կիրառմամբ ստացվել է ֆրոկտոոլիգոզաքարների խառնուրդ, որի չոր նյութերի վերջնական քանակը 76% է: Ստացված օլիգոզաքարների կազմը որոշվել է բարձր արդյունավետության հեղուկ քրոմատոգրաֆիայի (ԲՎՋԽ) և նրբաշերտ քրոմատոգրաֆիայի (ՆԶ) միջոցով:

Իմոբիլիզացված ֆերմենտներ – օսլա – ինուլին – ֆրոկտոոլիգոզաքարներ

Some properties of immobilized inulinase in high concentrations of the substrate for obtaining of fructooligosaccharides from starch and inulin have been studied. With application of highly active Cyclodextrinylglucosyltransferase (CGTase, EC 2.4.1.19) and immobilized inulinase (2,1-β-D-fructan-fructanhydrolase, EC 3.2.1.7) a mixture of fructooligosaccharides with final DM equal to 76% has been obtained. The composition of obtained oligosaccharides has been revealed by use of high performance liquid chromatography (HPLC) and thin layer chromatography (TLC).

Immobilized enzymes – starch – inulin – fructooligosaccharides

В настоящее время в связи с заметной недостаточностью различных сахаристых продуктов возникла необходимость поиска качественно новых источников и методов их получения. Особый интерес представляют крахмал и инулин [3, 4, 7, 9]. Из них по отдельности и совместно можно получить такие подсластители как фруктозоконцевые олигосахариды (ФКО), фруктоолигосахариды (ФОС), инулоолигосахариды (ИОС) и их производные [1, 2, 5, 6, 10, 16]. Производство вышеуказанных подсластителей даст возможность частично удовлетворить потребность в сахаре, а также использовать их в качестве сахарозаменителей для диабетиков.

Целью нашей работы являлось изучение процесса синтеза фруктоолигосахаридов из крахмала и инулина с помощью ЦГТазы *Bacillus stearothermophilus* и иммобилизованной инулиназы *Aspergillus flavus*.

Материал и методика. В работе использовали грибную культуру *A. flavus* из коллекции культур Центра депонирования микроорганизмов ННЦ „Армбиотехнология“, НАН РА. Культуру выращивали в глубинных условиях на качалке со скоростью вращения 200-220 об/мин при температуре 32°C на модифицированной среде Чапека следующего состава: инулин – 2 %; NaNO₃–0,2 %; KН₂РO₄ – 0,1 %; MgSO₄ x 7 Н₂O – 0,05 %; KCl – 0,05 %; FeSO₄— 0,001 % (рН 5,0).

Инулиназную и инвертазную активность определяли согласно описанным ранее методам [12,14]. Фруктозилтрансферазную активность определяли по методу, предложенному Зинченко [4], белок – по методу Лоури [15], инулин – по методу Ермакова [8]. Количество гидролизованного инулина определяли с использованием тиобарбитуровой кислоты (ТБК), редуцирующие вещества – методом Шомоджи-Нельсона [17, 18], глюкозу и фруктозу – по Бергмайеру [11]. Экстракцию низкомолекулярных углеводов проводили 82 %-ным этанолом при 45°C в течение 15 мин. Иммобилизацию инулиназы осуществляли методом, предложенным Абеяном [1]. Для анализа компонентного состава моно- и олигосахаридов использовали метод ВЭЖХ. Анализ углеводных экстрактов проводили на жидкостном хроматографе фирмы “Laboratorní přístroje Praha”, работающем в изократическом режиме на колонке, заполненной сорбентом “Separon SGX NH₂”. В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрил – вода, взятые в объемных соотношениях 75 : 25. Идентичность отдельных углеводов подтверждали посредством сравнения хроматографических характеристик (времени удерживания) стандартных образцов с исследуемыми и введением стандартных растворов в исследуемую смесь. Количественное определение проводили методом внутренней нормализации, т.е. на основе площади отдельных пиков хроматограмм, а также был использован метод ТХ.

Результаты и обсуждение. В последние годы одним из важнейших достижений в биотехнологии является получение органических соединений с применением ферментного катализа и биотрансформации. В основе этих разработок лежат специфические свойства ферментов, которые дают возможность в десятки и сотни раз ускорить различные взаимодействия, что заметно упрощает и удешевляет технологические процессы. Кроме того, специфичность ферментного катализа обеспечивает высокий выход целевого продукта и дает возможность организовать безотходное и экологически чистое производство. Однако применение интактных клеток и ферментов ограничено их низкой биостабильностью. Этот недостаток был устранен с применением иммобилизованных форм фермента и клеток его продуцентов.

Принимая во внимание это обстоятельство и проведенные нами исследования, иммобилизацию инулиназы осуществляли методом ковалентного связывания, используя при этом в качестве носителя крахмал + β- циклодекстрин.

Изучено влияние рН и температуры на активность иммобилизованной инулиназы. Выявлено, что в присутствии 45 %-ого субстрата биокатализатор может работать в пределах температур 60-65°C и рН 4,5-5,5 (рис.1, 2).

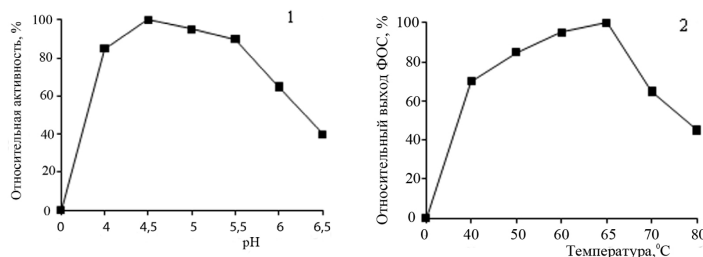


Рис. 1, 2. Влияние pH (1) и температуры (2) на активность иммобилизованной инулиназы

С целью изучения процесса синтеза фруктоолигосахаридов из крахмала и инулина к 20 г крахмала добавляли 20 мл дистиллированной воды (pH 6,5), 25 ед фермента ЦГТазы. Реакцию проводили при температуре 70°C в течение 24 ч с постоянным перемешиванием. Затем фермент инактивировали нагреванием реакционной смеси до температуры 80-85°C и обрабатывали активированным углем в течение 30 мин. Реакционную смесь фильтровали под вакуумом, полученный раствор охлаждали до температуры 60°C (pH 4,5), затем добавляли 10 г инулина и 10 ед иммобилизованной инулиназы.

Для выявления оптимальных pH и температуры трансгликозирования реакцию проводили в различных условиях в течение 24 ч с непрерывным перемешиванием. На рис. 3 и 4 показано влияние pH и температуры на синтез фруктоолигосахаридов.

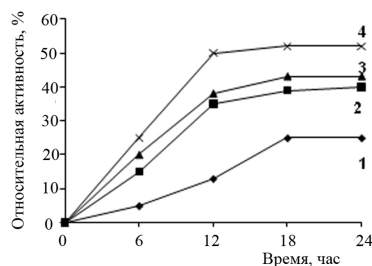


Рис. 3. Влияние pH на синтез фруктоолигосахаридов
1 – pH 4,0; 2 – pH 4,5; 3 – pH 5,0; 4 – pH 5,5

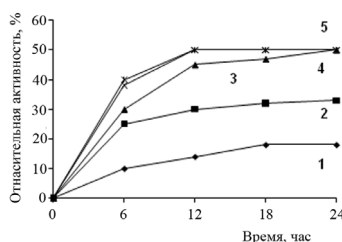


Рис. 4. Влияние температуры на синтез фруктоолигосахаридов
1 – 40°C; 2 – 50°C; 3 – 55°C; 4 – 60°C; 5 – 70°C

Проведенные исследования показали, что для трансгликозирования важное значение имеют pH и температура реакционной среды. Наилучший выход олигосахаридов наблюдается в пределах pH 5,0-5,5 и температуре 70°C. При оптимальных значениях pH и температуры с повышением количества фермента значительно увеличивается скорость реакции. Так, если при 25 ед (на 1 г инулина) реакция практически завершается в течение 4 ч, то при 20 ед необходимо 8 ч, а при меньшем количестве фермента степень трансгликозирования значительно падает (рис.5).

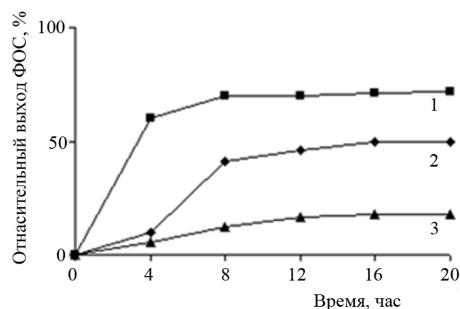


Рис. 5. Степень трансгликозилирования в зависимости от количества инулиназы
1- 25 ед; 2-20ед; 3-10ед:

С целью выделения и идентификации конечных продуктов к 100 г картофельного крахмала добавляли 100 мл дистиллированной воды (рН 6,5), 25 ед (на 1 г крахмала) ЦГТазы и реакцию проводили при температуре 70⁰С в течение 6 ч с постоянным перемешиванием. По истечении времени реакцию смесь охлаждали до температуры 60⁰С, рН доводили до 5,0-5,5, затем добавляли 50 г инулина, 25 ед иммобилизованной инулиназы (из расчета на 1г инулина) и реакцию продолжали в течение 5 ч. Затем ферменты инактивировали нагреванием реакционной смеси до температуры 80-85⁰С и обрабатывали активированным углем (в количестве 0,1% от объема) в течение 30мин, после чего отфильтровывали под вакуумом.

Очистка олигосахаридов была проведена с помощью специально переработанного активированного угля. Для этого 1 мл реакционной смеси вносили на заполненную активированным углем колонку (2,5-25 см) и последовательно элюировали дистиллированной водой (1 мл), затем 5%-ным (5 мл), 10%-ным (500 мл), 15,0 %-ным (500 мл) и 20 %-ным (200 мл) раствором этилового спирта. Соответствующие отдельные фракции были собраны, концентрированы до сиропообразного состояния и высушены под глубоким вакуумом при температуре 50-60⁰С.

По данным ВЭЖХ и тонкослойной хроматографии, водная фракция содержала только глюкозу и фруктозу (155 мг), раствор 5%-ного этилового спирта - только мальтозу, а остальные фракции содержали продукты трансформации, которые нумеровались как олигосахариды 1 (135 мг), 2 (130 мг) и 3 (60 мг).

Для выявления состава олигосахаридов применяли известные методы кислотного гидролиза, метилирования и метанолиза. По данным кислотного гидролиза, олигосахариды 1, 2 и 3 состояли из остатков глюкозы и фруктозы в молярном соотношении 1:2, 1:3 и 1:4, соответственно. Гликозиды, полученные в результате метанолиза, представляли собой метил-2.3.4.6-тетра-О-метил-D-глюкозид, метил-1.3.4.6-тетра-О-метил- и метил-3.4.6-три-О-метил-D-фруктозид в различном молярном соотношении.

Полученная смесь фруктоолигосахаридов состояла из глюкозы и фруктозы (до 30%), мальтозы (до 15%), 1 – кестозы (до 22%), нистозы (до 20%) и фруктозил-нистозы (до 13%) и по своей структуре мало отличалась от подсластителя “Neosugar G”, который в производственном масштабе получают в Японии.

Таким образом, полученный нами подсластитель имеет низкую калорийность, не кристаллизуется и может употребляться больными сахарным диабетом, при сохранении адекватного уровня потребления 2,0-5,0г в сутки, что подтверждает данные авторов [13].

ЛИТЕРАТУРА

1. Абелян В.А., Манукян Л.С. Иммобилизация микробной инулиназы на различных носителях. Прикладная биохимия и микробиология. 28, 3, с. 356-361, 1992.
2. Абелян В.А., Манукян Л.С., Африкян Э.Г. Получение фруктозо-глюкозного сиропа из инулинсодержащего сырья с применением иммобилизованных клеток дрожжей. Прикладная биохимия и микробиология. 34, 5, с. 544-548, 1998.
3. Жеребцов Н.А., Шеламова С.А., Абрамова И.Н. Биосинтез инулиназ бактериями рода *Bacillus*. Прикладная биохимия и микробиология. 38, 6, с. 634-638, 2002.
4. Зинченко О.Н., Кривошеева О.В., Лобанок А.Г. Трансгликозилазная активность 3-фруктофуранозидазы *Penicillium suaveum*. Прикл. биохим. и микробиол., 30, с. 330-555, 1994.
5. Ковалева Т.А., Холявка М.Г. Активность иммобилизованной инулиназы при непрерывном гидролизе экстракта топинамбура (*Helianthus tuberosus*). Вестник ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация, 5, с. 104-107, 2008.
6. Ковалева Т.А., Холявка М.Г., Таха А.С. Исследование некоторых параметров иммобилизованной инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* как перспективного катализатора реакции гидролиза инулина. Биотехнология, 2, с. 55-59, 2009.
7. Манукян Л. С., Кочикян В.Т., Андреасян Н.А., Афян К.Б., Балаян А.М. Выделение инулина из различного растительного сырья. Биолог. журн. Армении, 66, 4, 2014.
8. Петров К.П. Практикум по биохимии пищевого растительного сырья., М., Пищевая промышленность. с. 203-204, 1965.
9. Шаззо Р.И., Екутеч Р.И., Кондратенко В.В., Купин Г.А. Способ получения инулинсодержащего раствора из топинамбура. Патент РФ № 2493171, с. 4, 2012.
10. Balayan A.M., Ghochikyan V.T., Manukyan L.S., Andreasyan N.A., Afyan K.B., Afrikian E.K. Enzymatic and microbiological production of high – value products from inulin – containing raw materials. International Scientific Workshop Yerevan State University October 5-8, 2014, Yerevan, Armenia.
11. Bergmeyer H.U., Bernt E., Schmidt F., Stork H. D-Glucose: Determination with hexokinase and glucoses-phosphate dehydrogenase in Method of Enzymatic Analysis (2nd ed), edited by Bergmeyer H.U. New-York. Academic Press. 3, pp. 1196-1201, 1974.
12. Guirand J. P., Viard-Gaundin Ch., and Galzy P. Etude de L'inulinase de *Candida salmanticensis* Van Uden et Buckley. Agric. Biol. Chem. 44, 6, pp. 1245-1252, 1980.
13. Caselato de Sousa V. M., Freitas dos Santos E., Sgarbieri V.C. The Importance of Prebiotics in Functional Foods and Clinical Practice, Food and Nutrition Sciences, 2, 133-144, 2011.
14. Koops, A.J; Jonker, H.H. Purification and characterization of the enzymes of fructan biosynthesis in tubers of *Helianthus tuberosus* Colombia. II. Purification of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase and reconstitution of fructan synthesis *in vitro* with purified sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase and fructan:fructan 1-fructosyltransferase. Plant Physiol. 110, 1167-1175, 1996.
15. Lowry D H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent .J. Biol. Chem. 193, pp. 265-275, 1951.
16. Lüscher, M; Erdin, C; Sprenger, N; Hochstrasser, U; Boller, T; Wiemken, A. Inulin synthesis by a combination of purified fructosyltransferases from tubers of *Helianthus tuberosus*. FEBS Lett., 385, pp. 39-42, 1996.
17. Nelson N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem. 153, 2, pp. 375-380, 1944.
18. Somogyi M. Notes on sugar determination. J. Biol. Chem., 195, 1, pp. 19-23, 1952.

Поступила 05.12.2014



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 2(67), 2015

ԱՅԾՈՒՆԵՆԻՆ *SALIX* cf. *CAPREA* (SALICACEAE) ՆՈՐ ԱՆՆԱԲԵՐԴԻ (ՀԱՅԱՍՏԱՆ) ՄԻՋԻՆ ՊԼԵՅՍՏՈՑԵՆԻ ՏՐԱՎԵՐՏԻՆՆԵՐԻՑ

Ծ.Ֆ. ԱԼԵՔՍԱՆՅԱՆ¹, Ի.Գ. ԳԱԲՐԻԵԼՅԱՆ², Թ.Վ. ԲԱԳՅԱՆ³

¹Խ. Արովյանի անվ. Հայկական պետական մանկավարժական համալսարան,
tsovinareleksanyan@gmail.com

²ՀՀ ԳԱԱ Բուսաբանության ինստիտուտ, ivangabrielyan100@gmail.com

³ՀՀ ԳԱԱ Հնագիտության և ազգագրության ինստիտուտ, t.bagoyan2@yahoo.com

Նոր Ազնաբերդ-1 տեղավայրի միջին պլեյստոցենի հասակի տրավերտինների վրա դրոշմված տերևների մորֆոլոգիական հատկանիշների հիման վրա նկարագրված է Նոր տեսակ Հայաստանի տրավերտինային ֆլորայի համար՝ *Salix* cf. *caprea* L.:

Salix cf. *Caprea* – Նոր Ազնաբերդ-1 – տրավերտին – միջին պլեյստոցեն – պալեոկլիմա

На травертинах среднеплейстоценового возраста из местонахождении Нор-Азнаберд-1 по морфологии отпечатков листьев описан новый вид для травертиновых флоры Армении *Salix* cf. *caprea* L.

Salix cf. *Caprea* – Нор-Азнаберд-1 – травертин – средний плейстоцен – палеоклимат

On the basis of leaf morphology of fossil material from Nor Aznaberd-1 locality a new willow species – *Salix* cf. *caprea* L. for travertine flora of Armenia was identified. The travertine was dated as Middle Pleistocene.

Salix cf. *Caprea* – Nor Aznaberd-1 – travertine – middle pleistocene – paleoclimate

Հայաստանի նեոգեն-չորրորդական նստվածքաշերտերում բավականին մեծ տարածում ունեն կրային տուֆերը՝ տրավերտինները: Տրավերտիններ կարելի է հանդիպել հանրապետության տարբեր մարզերում: Դրանցից տարածքով և նստվածքների հզորությամբ ամենամեծը Արարատի մարզի տրավերտինների տեղավայրն է, որը գտնվում է Ուրցի լեռնաշղթայի հարավային լանջերի ստորոտում: ՀՀ հյուսիս-արևելյան շրջաններում տրավերտինային գոյացումներ կան Տավուշի մարզում՝ Նոյեմբերյան, Իջևան, Դիլիջան բաղաձայրների, Թեղուտ, Աղդան, Կողբ և այլ գյուղերի շրջակայքում: Տրավերտինների հանքավայրեր կան Լոռու մարզում՝ Սպիտակի, Վանաձորի հարակից տարածքներում, Շիրակի մարզի Գյումրի բաղաձայրի զոգահովտում, Բանդիվան գյուղի շրջակայքում: Մեծ ելքեր կան Կոտայքի մարզում՝ Մարմարիկ և Աղվերան, Ազատ գետերի ավազաններում՝ Հանքավան, Աղվերան, Արզական, Բուժական, Գառնի գյուղերի շրջակայքում: Մեծ են կուտակումները նաև Գեղարքունիքի մարզում՝ Սևանա լճի ավազանի մի շարք վայրերում: Խոշոր կուտակումներ կան Վայոց ձորի մարզի Խնձորուտ և Նոր Ազնաբերդ գյուղերի շրջակայքում, Սյունիքի մարզում՝ Գորիս բաղաձայրի հարավ-արևելյան մասում, Տաթև գյուղի շրջակայքում, Կապանում, Ստորին Գիրաթաղ գյուղի մոտ [1, 2]: Այդ կուտակումներից տերևների դրոշմների հստակությամբ մեծ հետաքրքրություն է ներկայացնում Վայոց ձորի մարզի Նոր Ազնաբերդ գյուղի շրջակայքում գտնվող տրավերտինների Նոր Ազնաբերդ-1 տեղավայրը: Այն հայտնա-

բերվել և այդտեղից առաջին անգամ բրածո նյութ է հավաքվել Ի.Գ. Գաբրիելյանի և Ն.Գ. Ալեքսանյանի կողմից 1998թ. ապրիլին: Նրանց կողմից հավաքվել է 51 նմուշ՝ բույսերի տարբեր օրգանների 93 դրոշմներով: Հետագայում բրածո բույսերի նմուշներ են հավաքվել Ս.Գ. Ժիլինի և Ի.Գ. Գաբրիելյանի, Ն.Գ. Ալեքսանյանի (1998թ.՝ օգոստոս), Ա.Մ. Բարսեղյանի, Ռ.Ա. Հովսեփյանի և Ի.Գ. Գաբրիելյանի (2001թ.), Ս.Ա. Նահապետյանի, Պ. Ռոյրոնի, Վ. Օլիվիերի և Ի.Գ. Գաբրիելյանի (2006, 2007թթ.) կողմից: Ընդհանուր առմամբ տրավերտինների Նոր Ազնաբերդ-1 տեղավայրից հավաքվել է 299 նմուշ՝ բույսերի 522 դրոշմներով: Դրոշմներում բացարձակ մեծամասնություն են կազմում տերևները: Քիչ քանակով հանդիպում են նաև պտուղների և սերմերի դրոշմներ: Տրավերտինների տեղավայրի շրջապատի հիմնական ժամանակակից բուսական համակեցություններն են գիհու և սաղարթավոր ծառափառտեսակների (արոսենի, թխկի, ցախակեռաս, ծորենի, մասրենի և այլն) չոր լուսավոր նոսրանտառները, լեռնային տափաստանները և գետամերձ ծառաթփուռային բուսականությունը:

Նոր Ազնաբերդ-1 տեղավայրը բավականին հարուստ է ուռենիների *Salix* ցեղի *Caprea* սեկցիայի տերևների դրոշմներով: Հարկ է նշել, որ Հայաստանի ներկայիս տարածքում հանդիպում է ժամանակակից այծուռենին (*Salix caprea* L.), որն ունի բավականին լայն տարածում և հանդիպում է Վերին Ախուրյանի, Լոռու, Իջևանի, Ապարանի, Սևանի, Գեղամա, Երևանի, Դարեղեգեզի, Չանգեզուրի և Մեղրու ֆլորիստիկ շրջաններում, ինչպես նաև Կովկասում, Եվրոպայում, Ասիայի մեծ մասում [4, 5]: Այն միջին մեծության ծառ է՝ 6-15 մ բարձրությամբ, հանդիպում է անտառներում՝ միայնակ, փոքր խմբերով կամ պուրակներով՝ ծովի մակերևույթից մինչև 3300 մ բարձրություններում:

Հաշվի առնելով վերոգրյալը և այն, որ մինչ այժմ չեն ուսումնասիրվել Նոր Ազնաբերդ-1 տեղավայրում հայտնաբերված այծուռենու բրածո մնացորդները, մեր առջև խնդիր ենք դրել ուսումնասիրել, նկարագրել և համեմատել դրանք ժամանակակից այծուռենու տերևների հետ, նպատակ ունենալով որոշակիացնել *Salix* ցեղի *Caprea* սեկցիայի բրածո տերևների կարգաբանական դիրքը:

Նյութ և մեթոդ: Մեր կողմից ուսումնասիրման նյութ են հանդիսացել տրավերտինների Նոր Ազնաբերդ-1 տեղավայրից 1998-2007 թթ. հավաքված նմուշները: Տրավերտինների կամ տրավերտինային տուֆերի Նոր Ազնաբերդ-1 տեղավայրը գտնվում է ՀՀ Վայոց Ձորի մարզի Նոր Ազնաբերդ գյուղի շրջակայքում՝ Վայքի լեռների արևելյան մասի հարավային մակրոլանջերին, խնձորուտ գետի աջակողմյան փոքրիկ վտակի հովտայանջերին՝ «Եղնիկի Ձոր» կոչվող վայրում: Տրավերտինային տուֆերի հանքաշերտի տեսանելի հատվածը զբաղեցնում է մոտ 1,5 կմ² տարածք՝ տեղ-տեղ հասնելով մինչև ապարների 20-30մ հզորության: Տրավերտինների տարիքը թվագրվել է որպես միջին պլեյստոցեն, ուրան/թորիումի ($^{230}\text{Th}/^{232}\text{Th}$) ռադիոակտիվ իզոտոպների մեթոդով [9], թվագրվելով ստորին շերտերում 335.4±3.4 հազ. տարվանից մինչև 327.7±12.5 հազ.տարի՝ վերին շերտերում:

Մեր կողմից որոշվել են 23 նմուշների վրա պահպանված այծուռենու տերևների 35 դրոշմներ: Բրածո տերևների դրոշմները պահպանվել են ֆրագմենտար ձևով: Տերևների մեծ մասի ծայրերը և կոթունները չեն պահպանվել: Տերևների հիմքերը բացակայում են, բացառությամբ Azn-2006/2b նմուշի: Ջրավորության ավելի մանրամասն ուսումնասիրության նպատակով առանձնացվել է առավել լավ պահպանված հինգ նմուշ՝ Azn-1998/34, Azn-2006/85, Azn-2006/3, Azn-2006/2a, Azn-2006/2b:

Նմուշները պահվում են ՀՀ ԳԱԱ Բուսաբանության ինստիտուտի ինեպրոսաբանական պահոցում (ERE-PB): Բրածո վիճակում գտնված տեսակի ճշգրիտ որոշման նպատակով վեր են հանվել ժամանակակից և բրածո տեսակների տերևների նմանությունները և տարբերությունները: Դրոշմները համեմատվել են ՀՀ ԳԱԱ Բուսաբանության ինստիտուտի հերբարիումի (ERE) ուռենի ցեղի ժամանակակից տեսակների տերևների հետ ձևաբանահամեմատական մեթոդի հիման վրա: Բույսերի կարգաբանության ճշման նպատակով օգտագործել ենք Չերեպանովի տեղեկատուն [6]: Տերևների նկարագրության և չափագրման համար օգտվել ենք կենսաբանության մեջ լայնորեն օգտագործվող մեթոդներից [7]: Տվյալները մշակվել են վիճակագրորեն [3]:

Ընտ.՝ Salicaceae Mirb.

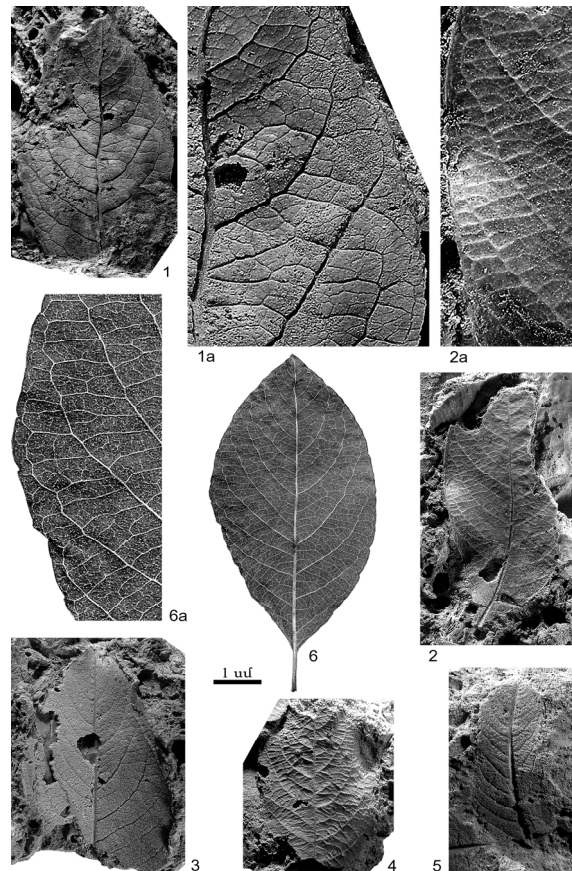
Ցեղ՝ *Salix* L.

Սեկցիա՝ *Caprea* Bluff et Fingerh.

Տեսակ՝ *Salix* cf. *caprea* L.

Արդյունքներ և քննարկում: Նմուշներ: Azn-1998/34, Azn-1998/12b, Azn-1998/18a,b,c, Azn-2001/16a,b,c, Azn-2001/31a, Azn-2001/37a,b,c, Azn-2001/38a, Azn-2001/42b, Azn-2001/44a,b,c, Azn-2006/2a,b, Azn-2006/3, Azn-2006/9a,b, Azn-2006/10, Azn-2006/32, Azn-2006/85, Azn-2007/3a,b, Azn-2007/5b, Azn-2007/6, Azn-2007/10, Azn-2007/14b, Azn-2007/19, Azn-2007/27a,b, Azn-2007/70:

Քրածո տերևների ընդհանուր նկարագրությունը: Տերևները պարզ են, ձվաձև, էլիպսաձև, լայն էլիպսաձև, լայնությունը 2,8-4 սմ, միջինը 3,6 սմ է, վերականգնված երկարությունը՝ 6,6-8,5 սմ, միջինը՝ 7,7 սմ: Գագաթները սրածայր են: Տերևաթիթեղի եզրերը ալիքաձև կամ թույլ ատամնաեզր են: Ջղավորությունը ուժեղ արտահայտված է: Երկրորդային ջղերը հիմնականում հերթադիր են, տերևաթիթեղի յուրաքանչյուր կողմում 8-10 հատ, հիմնական ջղից հեռանում են 50-69°, միջինը՝ 59,05° անկյան տակ, միջջղային տարածությունները հիմքից դեպի ծայրը սկզբից մեծանում են, այնուհետև՝ փոքրանում: Երկրորդային ջղերի անկյունները ևս հիմքի մոտ մեծ են, գագաթին մոտ՝ փոքր: Կան միջանկյալ (ինտերկալյար) ջղեր: Երրորդ կարգի ջղերը գրեթե ուղղահայաց են գլխավոր ջղին կամ կազմում են բութ անկյուն՝ 85-151°, միջինը՝ 113,9°, առաջացնում են խոշոր բջիջներ (ալվեոլներ), որոնցում երբեմն նշմարվում են վատ պահպանված չորրորդ կարգի ջղերը (նկ 1):



1-5 – *Salix cf. caprea* L., Նոր Ազնաբերդի տեղավայր՝ ՀՀ ԳԱԱ Բուսաբանության ինստիտուտի պահոց (ERE-PB), նմուշներ. 1- Azn-06/85a, 1a – նույնը՝ x 3; 2 – Azn-01/31a, 2a – նույնը՝ x 3; 3 – Azn-1998/34; 4 – Azn-01/30a; 5 – Azn-01/38a; 6 – *Salix caprea* L., ՀՀ ԳԱԱ Բուսաբանության ինստիտուտի հերբարիում (ERE), 6a – նույնը՝ x 3:

Համեմատական դիտողություններ: Ինչպես ժամանակակից *Salix caprea*, այնպես էլ բրածո *Salix cf. caprea* մոտ նկատվում են հետևյալ ընդհանրական հատկանիշները. տերևները պարզ են, հերթադիր, տերևաթիթեղը՝ ձվաձևից մինչև նշտարաձև, էլիպսաձև կամ լայն էլիպսաձև, տերևները համաչափ են, տերևաթիթեղի ամենալայն հատվածը միջին մասում է: Տերևաթիթեղի հիմքը կլոր է կամ լայն սեպաձև, հիմքի անկյունը՝ միջինը 95°, ծայրը սրացող է, անկյունը՝ միջինը 75°: Տերևաեզրը հարթ է կամ ալիքավոր, երբեմն հիմքից դեպի ծայրը՝ թույլ ատամնաեզր, այդ դեպքում ատամիկները անկանոն են, ատամնաձողերը (սինուսները)՝ գոգավոր:

Ջրավորությունը փետրածև է, ջղերը՝ արտահայտված: Կենտրոնական ջիղը հաստ է՝ 1-1,5 մմ, ավարտվում է անմիջապես գագաթում: Երկրորդային ջղերը հիմնականում հերթադիր են կամ ոչ կանոնավոր, չեն մտնում ատամիկների մեջ և տերևաեզրին մոտ առաջացնում են կիսաօղակներ: Տերևների միջջղային տարածությունները հիմքից դեպի ծայրը սկզբից մեծանում են, այնուհետև՝ փոքրանում: Հիմքից դեպի ծայրը փոքրանում են նաև երկրորդային ջղերի անկյունները: Կան միջանկյալ (ինտերկալյար) ջղեր: Երրորդ կարգի ջղերը հետագա կարգի ջղերի հետ միասին առաջացնում են խոշոր բջիջներ (ալվեոլներ):

Այսպիսով, այծուռենու բրածո և ժամանակակից տերևների մորֆոլոգիական հատկանիշները ընդհանուր առմամբ համընկնում են: Սակայն նկատվում են նաև որոշակի վիճակագրորեն հավաստի տարբերություններ: Այսպես, *S. caprea* երկրորդային ջղերը տերևաթիթեղի յուրաքանչյուր կողմում 6-9 հատ են, հիմնական ջղից հեռանում են 50-82°, միջինը՝ 65° անկյան տակ, իսկ *S. cf. caprea* մոտ 8-10 հատ, հիմնական ջղից հեռանում են 50-69°, միջինը՝ 59,05° անկյան տակ (աղ. 1): Փոքրիկ, սակայն ոչ էական տարբերություններ դիտվում են նաև երրորդ կարգի ջղերի անկյունների մեծությունների միջև: Այսպես, չնայած երկուսի մոտ էլ երրորդ կարգի ջղերը գրեթե ուղղահայաց են գլխավոր ջղին, սակայն *S. caprea* մոտ դրանց անկյունը տատանվում է 96-130°, միջինը՝ 107,2°, իսկ բրածոյինը՝ 85-151°, միջինը՝ 113,85°: Միաժամանակ *S. caprea* տերևներն ունեն (7)11-18 սմ երկարություն և (3)5-8 սմ լայնություն, իսկ *S. cf. caprea* տերևներն ունեն 7,7 սմ երկարություն և 3,6 սմ լայնություն (աղ. 1), ինչը բացատրվում է բրածո նմուշների վատ պահպանվածությամբ:

Ելնելով վերոգրյալից, կարելի է եզրակացնել, որ մեր կողմից նկարագրված դրոշմներն ունեն *Salix caprea* տեսակին բնորոշ հատկանիշներ, ինչը պատճառ է հանդիսացել, որ մենք բրածո տեսակը անվանենք *Salix cf. caprea* L.:

Աղյուսակ 1. *Salix cf. caprea* L. և *Salix caprea* L. տերևների ջղերի անկյունների համեմատությունը

Հատկանիշ	<i>Salix cf. caprea</i> L.			<i>Salix caprea</i> L.		
	M ± m	Lim (min-max)	n	M ± m	Lim (min-max)	n
II-ային ջղերի անկյունը	59,05±1,32	50-69	20	65,00±2,05	50-82	18
III-ային ջղերի անկյունը	113,85±4,12	88-143	20	107,2±2,9	96-130	15

Salix cf. caprea տեսակը Հայաստանում բրածո վիճակում հանդիպում է նաև Որոտան գետի ավազանում՝ Սիսիանի վաղ պլեյստոցենի հասակի դիատոմային կավերի քաղցրահամ լճային նստվածքաշերտերում՝ Շամբ-1, Ույծ-2, Տոլորս-2 տեղավայրերում: Դրանց հասակը թվագրվում է 1,3-0,9 մլն տարի [8]:

Ընդհանուր առմամբ Նոր Ազնաբերդ-1 տեղավայրի բրածո բույսերի համալիրը ցույց է տալիս միջին պլեյստոցենի ուսումնասիրված ժամանակահատվածի (մոտ 300 հազ. տարի առաջ) բուսականության ավելի խոնավատեր և ցրտասեր բնույթը: Համապատասխանաբար պալեոկլիման նույնպես ավելի ցուրտ ու համեմատաբար խոնավ է եղել, որի մասին է վկայում նաև *Salix* ցեղի այլ տեսակների, ինչպես նաև թխկու, հացենու, թեղու, կեչու և այլ ցեղերի տերևների ու պտուղների դրոշմների առկայությունը:

Մեր երախտագիտությունն ենթ հայտնում պրոֆեսոր Ս.Խ. Պիպոյանին, գիտական հարցերի վերաբերյալ մշտական օգնության և խորհրդատվության համար: Ընդհանրականություն ենթ հայտնում նաև Խնձորուտ գյուղի բնակիչ՝ որսորդ Թայթուկ Ալեքսանյանին տեղավայրի մասին տեղեկություններ հաղորդելու համար, ինչպես նաև Նազիկ Ալեքսանյանին և Բորիս Գասպարյանին դաշտային աշխատանքներին օժանդակելու համար:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. Асланян А.Т. Региональная геология Армении, Айпетрат, Ереван, 1- 431, 1958.
2. Геология Армянской ССР. Гл. ред. С.С. Мкртчян, 2, Стратиграфия, Изд. АН Арм. ССР, Ереван, 1-432, 1964.

3. *Кудрявцева Н.В.* Статистическая обработка результатов опытов. В кн.: Большой практикум по физиологии растений. М., Высшая школа, 184-201, 1975.
4. *Назаров М. И.* Род Ива – *Salix L.* В кн. Флора СССР, 5. Ред. В.Л. Комаров, Изд. АН СССР М.-Л., 24-216, 1936.
5. *Скворцов А.К.* Salicaceae. В кн. Флора Армении, 5. Ред. А.Л. Тахтаджян. Изд. АН АрмССР, Ереван, 325-361, 1966.
6. *Черепанов С.К.* Сосудистые растения России и сопредельных государств, С-П, Мир и семья-95, 1-991, 1995.
7. Manual of Leaf Architecture. Morphological description and categorization of dicotyledonous and net-veined monocotyledonous angiosperms by Leaf Architecture Working Group, 1-65, 1999.
8. *Ollivier V., Nahapetyan S., Roiron P., Gabrielyan I., Gasparyan B., Chataigner C., Joannin S., Cornee J.-J., Guillou H., Scaillet S., Munch P. and Krijgsman.* Quaternary volcano-lacustrine patterns and palaeobotanical data in southern Armenia. *Quaternary International*, 223-224, 312-326, 2010.
9. *Fietzke J., Liebtrau V., Eisenhauer A., Dullo C.* Determination of uranium isotope ratios by multi-statik MIC-ICP-MS: method and implementation for precise U- and Th-series isotope measurements. *JAAS* 20, 395-401, 2005.

Ստացվել է 16.12.2014



Биол. журн. Армении, 2 (67), 2015

РОЛЬ ГАЛАРМИНА В ИЗМЕНЕНИИ КОНЦЕНТРАЦИИ ТИРЕОТРОПНОГО И ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ В КРОВИ У КРЫС ПРИ СУБКЛИНИЧЕСКОМ ГИПОТИРЕОЗЕ

Т.С. ХАЧАТРЯН

*Институт прикладных проблем физики НАН РА
pharmatica@mail.ru*

Исследовались концентрации тиреотропного гормона гипофиза и тиреоидных гормонов в крови у крыс при субклиническом гипотиреозе до и после воздействия сверхмалых доз гипоталамического нейропептида галармина. Показано, что в условиях субклинического гипотиреоза у крыс наблюдалось резкое увеличение уровня концентрации тиреотропного гормона гипофиза и резкое снижение уровня концентрации тиреоидных гормонов в крови. После воздействия сверхмалых доз галармина в крови у крыс наблюдалось резкое снижение уровня тиреотропного гормона гипофиза и повышение уровня тиреоидных гормонов в крови, с достижением такового у интактных животных.

*Тиреотропный гормон гипофиза – тироксин – трийодтиронин – галармин –
субклинический гипотиреоз – гомеопатические дозы*

Յետազոտել է հիպոֆիզի թիրեոտրոպ հորմոնի և վահանագեղձի հորմոնների կոնցենտրացիայի աստիճանը առնետների արյան մեջ, ենթակլինիկական հիպոթիրեոզի պայմաններում, հիպոթալամիկ նեյրոպեպտիդ գալարմինի գերցածր չափաբաժինների կիրառումից առաջ և հետո: Ուսումնասիրությունները ցույց են տվել, որ առնետների մոտ ենթակլինիկական հիպոթիրեոզի պայմաններում նկատվել է արյան մեջ հիպոֆիզի թիրեոտրոպ հորմոնի կոնցենտրացիայի կտրուկ աճ և վահանագեղձի հորմոնների կոնցենտրացիայի կտրուկ նվազում: Գալարմինի գերցածր չափաբաժինների ազդեցության տակ կենդանիների արյան մեջ տեղի էր ունենում հիպոֆիզի թիրեոտրոպ հորմոնի կոնցենտրացիայի կտրուկ նվազում և վահանագեղձի հորմոնների բաղադրության կտրուկ աճ, որը բնորոշ է նորմալ կենդանիներին:

*Հիպոֆիզի թիրեոտրոպ հորմոն – թիրոքսին – տրիյոդթիրոնին –
գալարմին – ենթակլինիկական հիպոթիրեոզ*

The aim of this study was to investigate the features of thyroid-stimulating hormone and thyroid hormones concentrations in the blood of rats with subclinical hypothyroidism before and after injection of ultra-low doses of hypothalamic neuropeptide galarmin. Studies have shown that in case of rats with subclinical hypothyroidism a sharp increase in solution of thyroid-stimulating hormone level and a sharp drop in the level of thyroid hormones in the blood occurred. Ultra-low doses of galarmin in the blood of rats leads to the decrease in the concentration of thyroid-stimulating hormone and increase in the level of thyroid hormones, which reached their values in intact animals.

*Thyroid-stimulating hormone – thyroxin – triiodothyronine – galarmin –
subclinical hypothyroidism*

Известно, что неотложная защита от патогенных микроорганизмов у человека и животных обеспечивается механизмами врожденного иммунитета в ходе

реакций воспаления, фагоцитоза, секреции слизи и антимикробных факторов эпителиями барьерных органов [25]. Молекулярной основой системы врожденного иммунитета служит комплекс веществ, распознающих патогены и реализующих их элиминацию; среди них важную роль играют катионные антимикробные пептиды (АМП) и белки, содержащиеся в нейтрофилах, моноцитах, макрофагах, клетках барьерных эпителиев. АМП обладают различной первичной структурой и конформацией молекул, представляя несколько структурных семейств, отличающихся по спектру антимикробной активности и механизмам действия на микроорганизмы. Наряду с антибиотическими свойствами, АМП проявляют разнообразные эффекты в отношении и собственных клеток организма. Наиболее распространено и хорошо изучено семейство дефенсинов. Другим обширным структурным семейством АМП, хотя и значительно менее исследованным, являются обогащенные пролином пептиды, ПБП (или пролин-богатые пептиды – Proline-Rich Peptides, PRP). Эти пептиды обнаружены у животных различных таксономических групп – от беспозвоночных до млекопитающих. ПБП обладают высокой антимикробной активностью преимущественно в отношении грамотрицательных бактерий. Отличительным их является низкая токсичность для клеток млекопитающих. Наличие в структуре ПБП большого количества аминокислотных остатков пролина (до 50 %) обуславливает их свойство легко вступать во взаимодействие с различными белковыми молекулами, в том числе участвующими в ключевых биохимических каскадах реакций, которые обеспечивают функционирование иммунной системы. При таком взаимодействии пептиды могут модулировать функциональную активность этих белков, что и обуславливает проявление многообразных эффектов ПБП в отношении собственных клеток организма. Так, PR-39 из лейкоцитов свиньи оказывает противовоспалительное действие, ингибируя активность NADPH-оксидазной системы нейтрофилов [24]; ускоряет заживление ран, стимулируя синтез синдеканов [13]; влияет на рост сосудов [23].

Возможность регуляции активности клеток, экспрессирующих различные цитокины, может рассматриваться как эффективный путь коррекции патологического процесса [1]. Зная на продукцию каких цитокинов влияет компонент комплексного препарата, можно с уверенностью говорить, за счет каких механизмов реализуется то или иное свойство препарата [2]. Следует отметить, что продуцентами цитокинов могут выступать не только клетки иммунной системы (лимфоциты, макрофаги, моноциты), но и стромальные соединительнотканые клетки. Поэтому подкожное введение вызывает значимый по своей силе биологический ответ (путем активизации синтеза цитокинов). Таким образом, используя цитокининдуцирующий метод и определяя как различные концентрации сверхмалых доз (СМД) биологически активных веществ (БАВ) по аналогии с гомеопатическими дозами сверхразбавленных растворов воздействуют на цитокиновый профиль, возможно:

- инструментально подтвердить фармакологическую активность СМД БАВ;
- объяснить один из механизмов их действия;
- обосновать подбор схемы лечения в той или иной клинической ситуации

[15].

Для познания центральных нейрогуморальных механизмов регуляции всей иммунной системы большое значение имеют выявленные новые иммуномодуляторы мозга – ПБП, продуцируемые нейросекреторными клетками гипоталамуса, и установление их химической структуры. В последние годы определённый интерес представляет изучение молекулярных механизмов и определение места в многоуровневой системе иерархии нейрогормонов гипоталамуса пептидной природы. Регуляторные пептиды и сопряжённые с их функцией ферменты следует рассмат-

ривать как сложную адаптивную систему организма, организующую реализацию приспособительных реакций на всех уровнях его интеграции. К подобной группе жизненно важных пептидов с невыясненным до конца молекулярным механизмом действия относятся и богатые пролином пептиды, выделенные Галояном и сотр. из нейросекреторных ядер гипоталамуса (N. paraventricularis и N. Supraopticus) крупного рогатого скота. Впоследствии была выяснена первичная структура этих пептидов, что позволило их синтезировать [16]. Из выделенных пептидов наиболее изучен галармин (ГАЛ), состоящий из 15 аминокислот со следующей первичной структурой: Ala-Gly-Ala-Pro-Glu-Pro-Ala-Glu-Pro-Ala-Gln-Pro-Gly-Val-Tyr [18]. Воздействие ГАЛ на иммунную и нервную систему сопровождается заметной стимуляцией белкового, липидного и углеводного обменов. В последнем важное место занимает циклический аденозинмонофосфат-зависимая система ферментов, запускаемая аденилатциклазой, посредством активации которой гормоны (возможно, также и ГАЛ) регулируют клеточный обмен. Открытые академиком Галояном ПБП, к числу которых и относится ГАЛ, выделенные из нейросекреторных ядер гипоталамуса, представляют новую семью гипоталамических нейропептидов. Эти пептиды синтезируются в форме общего белка-предшественника (нейрофизин-вазопрессин ассоциированного гликопротеина) и генетически детерминированно разделяются протеолизом во время аксонального транспорта. Обнаружено, что данные пептиды обладают широким спектром биологической активности (БА), включая иммуномодулирующие и нейропротективные свойства, и могут являться регуляторами гуморального и клеточного иммунитета, миелопозза, дифференциации тимоцитов. Показано, что один из этих пептидов – ГАЛ, обладает свойствами цитокина и стимулирует антиген-представляющую функцию макрофагов, продукцию этими клетками фактора некроза опухолей (TNF-®) и секрецию интерлейкинов (IL-1 и IL-6) астроцитами [17].

На сегодняшний день субклинический гипотиреоз (СГТ) является наиболее часто встречаемым и наиболее изученным синдромом в эндокринологии. Тем не менее, в диагностике и лечении этого патологического состояния остаётся много вопросов, не имеющих однозначной трактовки. Поэтому среди учёных разных стран не ослабевает интерес к изучению различных аспектов СГТ, синдрома, обусловленного стойким дефицитом тиреоидных гормонов (ТГ) в организме [10].

В последние годы наметилась тенденция к сближению и синтезу двух, до недавнего времени антагонистических, областей медицины – фармакотерапии и гомеопатии, прежде всего, в связи с широким применением комплексных гомеопатических средств [5, 8]. Несмотря на то что механизмы гомеотерапии не могут быть в полной мере объяснены в рамках современной биологической парадигмы, базирующейся преимущественно на молекулярных представлениях, именно практические аргументы эффективности и безопасности служат основой для внедрения гомеопатических средств в широкую практику [3, 4].

Вместе с тем в проводимых в настоящее время исследованиях продолжают отсутствовать сведения относительно изолированного применения сверхмалых доз (СМД) 10^{-13} – 10^{-17} М АМП, в частности, использованного в данных сериях исследований ГАЛ при СГТ в изучении процессов изменения концентрации тиреотропного гормона гипофиза (ТТГ), свободного трийодтиронина (Т3), свободного тироксина (Т4) в сыворотке крови у крыс.

Материал и методика. Исследования проведены на 80 12-месячных крысах-самцах линии Вистар в условиях полухронического эксперимента, разделенных на 7 подопытных групп:

1. контрольные животные – 10 экз.;
2. животные с СГТ, не получавшие СМД ГАЛ – 20 экз.;
3. животные с СГТ, получавшие в течение 14 послеоперационных дней СМД 10^{-13} М ГАЛ – 10 экз.;
4. животные с СГТ, получавшие в течение 14 послеоперационных дней СМД 10^{-14} М ГАЛ – 10 экз.;
5. животные с СГТ, получавшие в течение 14 послеоперационных дней СМД 10^{-15} М ГАЛ – 10 экз.;
6. животные с СГТ, получавшие в течение 14 послеоперационных дней СМД 10^{-16} М ГАЛ – 10 экз.;
7. животные с СГТ, получавшие в течение 14 послеоперационных дней СМД 10^{-17} М ГАЛ – 10 экз.;

В экспериментальных исследованиях использовалась хирургическая модель СГТ. Патологическое состояние щитовидной железы (ЩЖ) крыс было получено путём проведения операции тиреоидэктомии (ТЭК). ТЭК осуществлялась по следующему алгоритму. До проведения операции крысы под эфирным наркозом фиксировались в положении на спине. Доступ к ЩЖ осуществлялся через разрез кожи в области шеи длиной около 2,5 см. Затем обнажалась ЩЖ, производилась отпрепаровка 2/3 её части с сохранением парашитовидных желёз и с помощью острых ножниц доли отсекались, после чего под каждую из них подводились лигатуры. Раны послойно зашивались. Животные хорошо переносили операцию и спустя 0,5-1 ч после него подходили к корму и воде. Всего было подвергнуто ТЭК 70 крыс.

В данных сериях исследований применялся сверхразбавленный раствор ГАЛ, подвергшийся особому процессу – потенцированию. Последнее представляет собой последовательное разведение исходного раствора в сочетании с внешним физическим воздействием (механическое встряхивание, обработка с помощью звукового генератора и др.). Не подвергшиеся процессу потенцирования растворы, содержащие СМД лекарственных средств (при разбавлении выше числа Авогадро) БА не обладают [6, 11]. Процедуру разведения и получения гомеопатических делений ГАЛ выполняли с соблюдением технологических правил, изложенных в руководствах по гомеопатии [7, 9], потенцирование проводили многостаканным (в нескольких емкостях) методом С. Ганемана. Исходным раствором (уртинктурой, материнской тинктурой) для приготовления высокопотенцированных делений химических ГАЛ служил его маточный раствор, полученный стократным разведением нативного образца абсолютизированным спиртом и содержащий 9,2 мг/мл действующего начала ($3,4 \times 10^{-3}$ М). При последующих разведениях в качестве индифферентного вещества-носителя использовали дистиллированную воду. В соответствии со схемой, определённой методом потенцирования по С. Ганеману, для получения каждого деления использовали отдельную ёмкость – герметически закрывавшуюся склянку тёмного стекла. Перенос аликвоты предыдущего разведения в склянку с последующим осуществлением стерильными одноразовыми инсулиновыми шприцами, распаковывавшимися непосредственно перед процедурой переноса и менявшимися на каждой ступени разведения. Перенос завершали динамизацией. Все манипуляции выполняли в помещении, защищенном от непосредственного воздействия солнечного света. В процессе приготовления применяли десятичную (децимальную) шкалу разведения, традиционно использующихся в гомеопатической практике и принятую Гомеопатической книгой лекарств (ГКЛ). При пользовании этой шкалой на каждой ступени разведения достигали десятикратного разбавления “основы”. В соответствии с установившимися правилами десятичные деления обозначали буквой D (decim – десять). В итоге описанным путем было получено 5 потенцированных децимальных делений ХЭД и ГАЛ (D13 – 10^{-13} М; D14 – 10^{-14} М; D15 – 10^{-15} М; D16 – 10^{-16} М; D17 – 10^{-17} М).

После ТЭК и окончания внутримышечных инъекций СМД D13 – D17 М ГАЛ в течение 14 послеоперационных дней у исследуемых животных была проведена декапитация и осуществлён сбор крови. Взятие крови у животных всех исследуемых групп проводят декапитацией головы животного. Животных предварительно выдерживали в термостате в течение 2-5 мин при температуре 40-42°C (происходит повышение обмена веществ и разжижение крови), затем с помощью пинцета фиксировали за складку кожи на загривке и отсекали голову стерильными ножницами. Кровь собирали с помощью воронки в тонкие пробирки Уленгута до предсмертных судорожных конвульсий тела. Кровь порциями выбрасывалась в

воронку. Кровь после взятия 25-30 мин выдерживали в термостате (35-37°C), затем сгусток ее обводили тонкой стеклянной палочкой (отделение сгустка от стенок сосуда) и ставили на 16-18 ч в холодильник. Сыворотку отсасывали пипеткой с помощью груши, переносили в стерильный сосуд, закрывали крышкой и хранили в холодильнике. Таким образом получали до 1,5-2 мл крови и $\approx 0,5$ мл сыворотки. Отличительным преимуществом предлагаемого способа взятия крови у крыс является ее доступность, что позволяет повысить выход собираемой крови и сыворотки, не изменяя при этом ее качественных показателей и изучить влияние исследуемых препаратов на организм животного.

В сыворотке с помощью метода иммуноферментного анализа (ИФА) определялась концентрация ТТГ, свободного Т3 и свободного Т4 посредством иммуноферментного анализатора RISER 8793 с набором "Elisa деоксиниваленола (W81115)". В данных сериях исследований принцип работы набора заключался в том, что определение уровня ТТГ (или ТГ) основано на использовании конкурентного варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы машинные моноклональные антитела к ТТГ (или ТГ). В лунку планшета вносили исследуемый образец и конъюгат (Т4, конъюгированный с пероксидазой). Во время инкубации ТТГ (или ТГ) образца конкурирует с конъюгированным ТТГ (или ТГ) за связывание с антителами на поверхности лунки. В результате образуется связанный с пластиком "сэндвич", содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина в лунках происходит окрашивание растворов. Интенсивность окраски обратно пропорциональна концентрации ТТГ (или ТГ) в исследуемом образце. Концентрацию ТТГ (или ТГ) определяли по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания ТТГ (или ТГ) в калибровочных пробах.

Достоверность различий оценивали на основе параметрического однофакторного дисперсионного анализа (one-way Anova) и постдисперсионного анализа Холм-Сидака с помощью пакета программ Sigma Plot 3.5 for Windows.

Результаты и обсуждение. В представленной серии исследований нами было изучено дозозависимое влияние СМД 10^{-13} М- 10^{-17} ГАЛ на изменение уровня концентрации ТТГ в сыворотке крови 12-месячных белых крыс-самцов при СГТ (рис. 1).

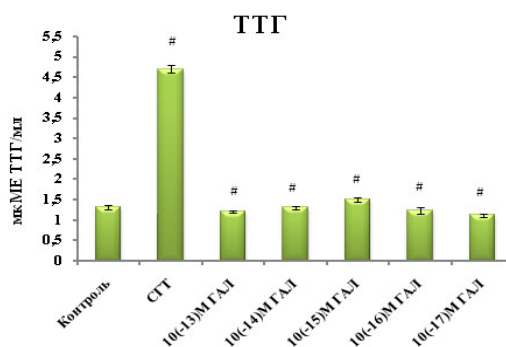


Рис. 1. Дозозависимое влияние галармина (ГАЛ) на концентрацию тиреотропного гормона (ТТГ) в сыворотке крови 12-месячных белых крыс-самцов при субклиническом гипотиреозе. Постдисперсионный анализ Холм-Сидака при сравнении всех групп: $F=86.29$, $p < 0.001$.

В проведенных исследованиях у гипотиреоидных крыс наблюдается резкое повышение уровня концентрации ТТГ в сыворотке крови на 499,2 % по сравнению с контрольными животными. После воздействия СМД 10^{-13} ГАЛ наблюдалось резкое снижение уровня концентрации ТТГ в сыворотке крови у крыс с СГТ, составляющее 98,4 %. В случае СМД 10^{-14} ГАЛ – 97,9%; СМД 10^{-15} ГАЛ – 96,1 %; СМД 10^{-16} ГАЛ – 97,8 % СМД 10^{-15} ГАЛ – 96,1 %; СМД 10^{-16} ГАЛ – 97,8 % и СМД 10^{-17} М ГАЛ – 99,6 %.

Подводя итоги данной серии исследований, можно сделать вывод о том, что все использованные СМД ГАЛ проявляли протекторное действие в отношении изменения референсных диапазонов концентрации ТТГ в сыворотке крови у крыс.

В следующей серии исследований нами было изучено дозозависимое влияние ГАЛ на концентрацию свободного Т3 в сыворотке крови 12-месячных белых крыс-самцов при СГТ (рис. 2).

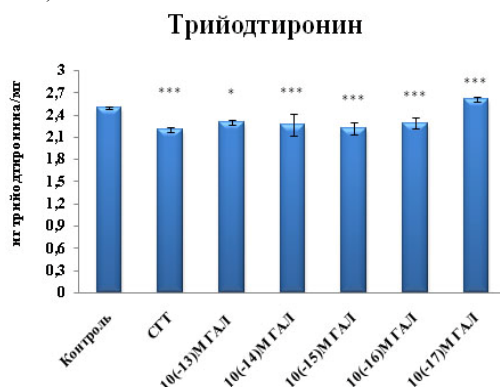


Рис. 2. Дозозависимое влияние ГАЛ на содержание свободного трийодтиронина (Т3) в сыворотке крови 12-месячных белых крыс-самцов при СГТ.
Постдисперсионный анализ Холм-Сидака при сравнении всех групп: $F=14.9$, $p<0.001$.

В проведенных исследованиях наблюдалось стойкое плавное снижение уровня концентрации свободного Т3 в сыворотке крови у гипотиреоидных крыс на 11,4 % по сравнению с контрольными животными. В сыворотке крови у крыс после воздействия СМД 10^{-13} М ГАЛ наблюдается плавное повышение уровня концентрации свободного Т3 на 12,1 %; в случае СМД 10^{-14} М ГАЛ – 10,4 %; СМД 10^{-15} М ГАЛ – 9,7 %; СМД 10^{-16} М ГАЛ – 10,9 % и СМД 10^{-17} М ГАЛ – 2,1 %

Подводя итоги данной серии исследований, можно сделать вывод о том, что все использованные СМД ГАЛ, за исключением СМД ГАЛ 10^{-17} М, проявляли протекторное действие в отношении изменения референсных диапазонов концентрации свободного Т3 в сыворотке крови.

На следующем этапе исследований нами было изучено дозозависимое влияние ГАЛ на концентрацию свободного Т4 в сыворотке крови 12-месячных белых крыс-самцов при СГТ (рис. 3). В сыворотке крови у крыс после воздействия СМД 10^{-13} М ГАЛ наблюдалось плавное повышение уровня концентрации свободного Т4 на 7,3 %; в случае СМД 10^{-14} М ГАЛ – 3,8 %; СМД 10^{-15} М ГАЛ – 9,2 %; в случае СМД 10^{-16} М ГАЛ – 9,7 % и СМД 10^{-17} М ГАЛ – 3,6 %.

Подводя итоги, можно сделать вывод о том, у гипотиреоидных крыс все использованные СМД ГАЛ проявляли протекторное действие в отношении изменения референсных диапазонов концентрации свободного Т4 в сыворотке крови. Проявление БА у 12-месячных крыс с СГТ при изолированной аппликации СМД ГАЛ согласуется с данными литературы [27]. Эти проявления обусловлены, вероятно, сходством рассматриваемого химического соединения к возбуждающему НМ АХ, а также феноменом воздействия СМД БАВ на процессы метаболизма у млекопитающих и человека, происходящем на внутриклеточном уровне. Известно, что быстро развивающиеся, острые и хронические заболевания ЩЖ без каких-либо клинических

ких проявлений тиреоидной патологии связаны с понижением сывороточного уровня свободных Т3 и Т4 и повышением ТТГ. Это часто трактуется как нетиреоидное состояние. Высокая распространённость нетиреоидных заболеваний, обусловленная недостаточным питанием и наличием хронических заболеваний, затрудняет адекватную оценку функции ЩЖ в старших группах пациентов [14]. В исследованиях [21] у 63 испытуемых обнаружены признаки нетиреоидных заболеваний, обусловленные низким уровнем ТГ и высокой концентрацией сывороточного ТТГ. У этих пациентов часто выявлялись гипертензия, атеросклероз, невыраженные признаки сердечной недостаточности, хронические обструктивные заболевания легких, диабет и/или артрит.

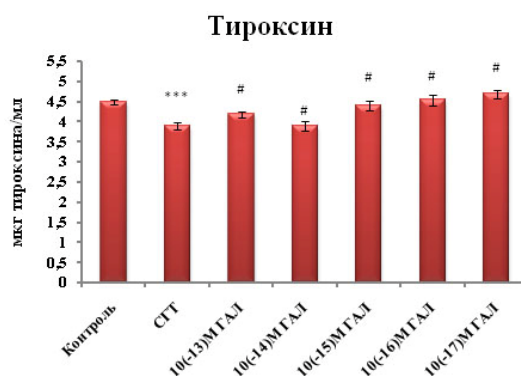


Рис. 3. Дозозависимое влияние галармина (ГАЛ) на содержание свободного тироксина (Т4) в сыворотке крови 12-месячных белых крыс-самцов при субклиническом гипотиреозе (СТГ). Постдисперсионный анализ Холм-Сидака при сравнении всех групп: $F=8.55$, $p<0.001$.

Примечательно, что не зависящий от заболеваний высокий уровень ТТГ ассоциировался с незначительными клиническими проявлениями патологии. Вероятно, это может быть обусловлено характером питания пациента, так как недостаток калорий приводит к росту уровня сывороточного ТТГ [19]. Также важную роль в этом процессе играет потребление селена и ряда других веществ (например, йода), поскольку селен является неотъемлемым микроэлементом, необходимым для дейодирования ТГ. Как уже отмечалось выше, на результаты тестов функциональной активности ЩЖ у пожилых людей могут влиять неполноценное питание, наличие определенных заболеваний и прием медикаментов. Хорошо известно, что существует четкая прямая зависимость между возрастом и приемом фармацевтических препаратов [20].

Лекарственные средства могут вызывать ГПТ (литий); гипертиреоз (амиодарон); изменять показатели тестов функциональной активности ЩЖ без прямого влияния на функцию железы путем воздействия на тироксинсвязывающий глобулин (глюкокортикоиды, эстрогены) или путем связывания Т4 тироксинсвязывающим глобулином (гепарин), а также через супрессию конвертации Т4 в Т3 (глюкокортикоиды, амиодарон, пропранолол). Именно поэтому при оценке результатов функциональной активности ЩЖ у пожилых пациентов следует учитывать возможное влияние указанных факторов. Кроме того, в пожилом возрасте на эти показатели могут влиять и другие параметры – генетические изменения и психологические факторы. Так, в исследованиях нескольких последних лет была выявлена роль генетического полиморфизма в генезе тиреоидных нарушений, а также было установлено, что генетические факторы являются основными причинами различий в результатах тестов функциональной активности ЩЖ у разных пациентов [26].

В экспериментальных исследованиях [22] установлено, что у крыс старшей возрастной группы генетический полиморфизм в генезе тиреоидных нарушений связан с уровнем сывороточного свободного ТЗ, телосложением и инсулинрезистентностью. Субклиническое течение заболеваний ЩЖ встречается довольно часто, а длительный СГПТ может привести к клинически значимым заболеваниям. Более того, различного рода осложнения могут развиваться даже в латентном периоде заболевания. В связи с этим, вероятно, раннее выявление субклинических форм нарушений ЩЖ способствует улучшению прогноза и выработки оптимальной стратегии лечения посредством применения БАВ у млекопитающих [12].

Подводя итоги проведенных серий исследований, можно сделать вывод о том, что у 12-месячных крыс с СГТ наблюдается изменение показателей ТТГ и свободных ТГ. Наибольший интерес вызывает установленный нами факт относительно протекторного воздействия в отношении уровня концентрации ТТГ, свободного ТЗ и свободного Т4 у гипотиреоидных крыс ГАЛ в СМД 10^{-13} – 10^{-17} М, являющегося гипоталамическим нейропептидом. Данное воздействие характеризуется нормализацией концентрации ТТГ и ТГ в сыворотке крови у 12-месячных крыс, выраженной в повышении референсных диапазонов концентрации после воздействия СМД ГАЛ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Априкян В.С., Галоян А.А. Иммунокорригирующие свойства нового гипоталамического полипептида при макрофаг ассоциированных бактериальных дисфункциях. Мед. наука Армении НАН РА, XXXIX, 4, с.29-36, 1999, а.
2. Априкян В.С., Галоян А.А. Иммунопротективные свойства нового гипоталамического полипептида при бактериальных патологиях. Мед. наука Армении НАН РА, XXXIX, 2, с.23-29, 1999, б.
3. Булатов В.В., Хохоев Т.Х., Дикий В.В., Заонегин С.В., Бабин В.Н. Проблема малых и сверхмалых доз в токсикологии. Фундаментальные и прикладные аспекты. Рос. хим. ж., XLVI, 6, с. 58-62, 2002.
4. Зеликман Т.Я., Ялкут С.И. Гомеопатия в системе фармакотерапии. Киев, Изд. "Здоров'я", 1994, 80 с.
5. Зильбер В. Роман о гомеопатии: главы из книги. Наука и жизнь, 12, с. 89-92, 2000.
6. Иванова К.С. Справочное пособие по гомеопатии. Ставрополь: АСОК-ПРЕСС, 190 с., 1991.
7. Неш Е.Б. Ведущие симптомы в гомеопатии. Харьков, Прогресс-ЛТД, 224 с., 1993.
8. Попова Т.Д. MATERIA MEDICA. Гомеопатические лекарства: Справочник. Центр гомеопатии МЗ УССР; НВЦ "ЛАМО", 192 с., 1991.
9. Стоукс Дж. Гомеопатия. М., ФАИР-ПРЕСС, 272 с., 2000.
10. Широкова В.И., Голоденко В.И., Демин В.Ф. Йодная недостаточность: диагностика и коррекция. Педиатрия, 6, с. 68-72, 2005.
11. Эпштейн О.И., Береговой Н.А., Сорокина Н.С., Старостина М.В., Штарк М.Б. Влияние различных разведений потенцированных антител к мозгоспецифическому белку S-100 на динамику посттетанической потенциации в переживающих срезах гиппокампа. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 127, 3, с. 17-32, 1999 а.
12. Cacicedo L., Garcia M. D., Escobar G. M. Plasma and pituitary thyrotrophin (TSH) in severe and prolonged hypothyroidism, as studied in the rat. J. Clin. Endocrinol. (Oxf), 6, 1, pp. 49-56, 1977.
13. Chan Y.R., Gallo R.L. PR-39, a syndecan-inducing antimicrobial peptide, binds and affects p130 (Cas). J Biol. Chem., 273, 44, pp. 28978-28985, 1998.

14. *Dolidze N.M., Kezeli D.D., Kilasoniya L.O.* Changes in intra- and extracellular Ca^{2+} concentration and prostaglandin E2 synthesis in osteoblasts of the femoral bone in experimental hyper- and hypothyroidism. *J. Bull. Exp. Biol. Med.*, 144, 1, pp. 17-20, 2007.
15. *Galoyan A.A.* Brain Neurosecretory Cytokines: Immune Response and Neuronal Survival. Kluwer Academic/Plenum Publishers. 188 p., 2004.
16. *Galoyan A.A.* Neurochemistry of brain neuroendocrine immune system: signal molecules. *J. Neurochem. Res.*, 25, pp. 1343-1355, 2000 a.
17. *Galoyan A.A., Aprikyan V.S.* A new hypothalamic polypeptide is a regulator of myelopoiesis. *J. Neurochem. Res.*, 27, 4, pp. 305-312, 2002.
18. *Galoyan A.A., Terio T., Berg M., Marks N.* Effects of proline-rich peptide derived from Neurophysin-II on caspases of murine neuroblastoma: evidences for caspase-2 and -6 activation. *J. Neurochemistry (RAS and NAS RA)*, 17, pp. 185-188, 2000 b.
19. *Ge J.F., Peng Y.Y., Qi C.C., Chen F.H., Zhou J.N.* Depression-like behavior in subclinical hypothyroidism rat induced by hemi-thyroid electrocauterization. *J. Endocrine.*, 45, 3, 430-438, 2014.
20. *Greenberg A.H., Czernichow P., Reba R.C., Tyson J., Blizzard R.M.* Observations on the maturation of thyroid function in early fetal life. *J. Clin. Invest.*, 49, 10, pp. 1790-1803, 1970.
21. *Hifumi T., Okada I., Kiri N., Hasegawa E., Ogasawara T., Kato H., Koido Y., Inoue J., Abe Y., Kawakita K., Hagiike M., Kuroda Y.* Thyroid hormone alterations in trauma patients requiring massive transfusion: An observational study. *World J. Emerg. Med.*, 5, 4, pp. 270-274, 2014.
22. *Kieffer J.D., Mover H., Federico P., Maloof F.* Pituitary-thyroid axis in neonatal and adult rats: comparison of the sexes. *J. Endocrinology*, 98, 2, pp. 295-304, 1976.
23. *Li D., Hettle S., McLean J., Macdonald C.* Survival of 3T3 cells expressing or co-expressing bFGF and/or IGF-I and/or IGF-II in low serum and serum free media. *J. Cytotechnology*, 32, 3, pp. 209-218, 2000.
24. *Shi X.P., Yin K.C., Ahern J., Davis L.J., Stern A.M., Waxman L.* Effects of N1-guanyl-1, 7-diaminoheptane, an inhibitor of deoxyhypusine synthase, on the growth of tumorigenic cell lines in culture. *J. Biochim. Biophys. Acta.*, 1310, 1, pp. 119-126, 1996.
25. *Singh S., Chang H.Y., Richards T.M., Weiner J.P., Clark J.M., Segal J.B.* Glucagonlike peptide 1-based therapies and risk of hospitalization for acute pancreatitis in type 2 diabetes mellitus: a population-based matched case-control study. *JAMA Intern. Med.*, 173, 7, pp. 534-539, 2013.
26. *Vosberg H., Wagner H., Böckel K., Hauss W.H.* Age-dependent changes of hypophysis-thyroid-regulation. *J. Aktuelle Gerontol.*, 6, 6, pp. 279-284, 1976.
27. *Xu Y., He W., Chen H., Hu Z., Li J., Zhang T.* Impact of the adaptive statistical iterative reconstruction technique on image quality in ultra-low dose CT. *J. Clin. Radiol.* 1, pp. 260-263, 2013.

Поступила 20.01.2015



Биол. журн. Армении, 2 (67), 2015

РЕПРОДУКТИВНЫЕ СВОЙСТВА КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ РАЗНЫХ МЕТОДАХ КОНСЕРВАЦИИ

К.В. ЧИТЧЯН, М.А. КИНОСЯН, Н.Л. КАЗАНЧЯН, Н.С. ХАЧАТУРЯН, С.А. ГЕВОРГЯН, А.Г. АКОПЯН,
Т.С. ДАВИДЯН

Центр депонирования микробов НПЦ “Армбиотехнология” НАН РА
microbio@sci.am

Представлены данные о сравнительной эффективности использования методов под-держания жизнеспособности различных микроорганизмов на питательных средах с использованием глицерина, вазелина и других консервантов.

Установлена эффективность сохранения их репродуктивных свойств при хранении на природных субстратах. Особое внимание уделено хранению культур молочнокислых бактерий, дрожжей, а также грибных организмов.

Коллекции культур микроорганизмов – молочнокислые бактерии – фитопатогены – дрожжи – грибы – репродукция

Տվյալներ են բերվում տարբեր սննդամիջավայրերի վրա մանրէների կենսունակության պահպանման մեթոդների կիրառման համեմատական արդյունավետության մասին օգտագործելով գլիցերին, վազելին և այլ կոնսերվանտներ:

Հաստատվել է բնական սուբստրատների վրա նրանց վերականգնողական հատկությունների պահպանման արդյունավետությունը: Հատուկ ուշադրություն է հատկացվել կաթնաթթվային բակտերիաների, շաքարասնկերի, ինչպես նաև սնկերի պահպանմանը:

Մանրէների կուլտուրաների հավաքածուներ – կաթնաթթվային բակտերիաներ – ֆիտոպաթոգեններ – շաքարասնկեր – սնկեր – վերարտադրողականություն

The data on application of glycerol, vaseline and other conservants for long-term maintenance of various microorganisms are presented.

Efficiency in use of natural substrates for maintenance of their viability on natural substrates has been established. Special emphasis was put to the maintenance of lactobacteria, yeast and fungi.

Microbial Culture Collection – lactic acid bacteria – phytopathogens – yeast – fungi – reproductivity

В Центре депонирования микробов НПЦ “Армбиотехнология” НАН Арме-нии (ЦДМ) поддерживается обширная (около 13000 штаммов) коллекция культур микроорганизмов: аэробные спорообразующие бактерии – 8550 штаммов, молочнокислые бактерии – 500 штаммов, неспорообразующие бактерии – 1000 штам-мов, грибы (митоспорические и базидиальные) – более 1200 штаммов, дрожжи и актиномицеты – более 700 штаммов. Коллекция является основным Республиканским хранилищем генофонда микроорганизмов, представляющих интерес как для проведения научно-исследовательских разработок, так и для создания новых биотехнологий.

Особую ценность представляют микроорганизмы - продуценты различных биологически активных соединений, биодегранты полимерных материалов и другие. Коллекционный фонд микроорганизмов поддерживается методами лиофилизации, криоконсервации, под слоем вазелинового масла, а также периодическими пересевами культур на соответствующие питательные среды.

Главной задачей коллекции является гарантийное хранение культур в жизнеспособном состоянии с характерными свойствами, а также предупреждение из-менений и мутаций, т.е. сохранение микроорганизма в состоянии, максимально близком к исходно выделенному штамму [1, 4, 7, 10, 11, 18].

Традиционные методы поддержания культур микроорганизмов сводятся к их выращиванию на богатых питательных средах с частыми пересевами. При этом имеют место мутационные изменения и автоселекция, что часто приводит к потере у штаммов важных физиолого-биохимических свойств [2-5,11,12].

Целью статьи является выявление эффективности традиционных методов хранения культур применительно к отдельным группам микроорганизмов с сохранением их характерных свойств.

Материал и методика. Объектом исследования служили молочнокислые бактерии (МКБ), дрожжи, митоспорические грибы и неспороносные бактерии разных видов.

Периодические пересевы: традиционным методом хранения культур является их периодический пересев на свежие соответствующие среды. Интервал между пересевами зависит от микроорганизма, используемой среды и условий хранения (от 15 дней до одного года) [1,4,15].

Хранение под вазелиновым маслом: культуры выращивали на агаризованных косяках. После инкубации в пробирки заливали слой вазелинового масла не менее 1 см [1, 4, 7, 11].

Криоконсервация в глицерине: 40%-ный раствор глицерина разливали в пробирки по 3 мл и стерилизовали при 1 атм 30 мин, затем вносили по 0,1 мл густой суспензии штаммов и закладывали в холодильную камеру при -20°C , -40°C , -60°C [1, 3, 4].

Криоконсервация в жидком азоте: криопротектор – 10%-ный глицерин разливали по 2 мл и стерилизовали при 1 атм 15 мин. В подготовленные пробирки вносили густую суспензию испытуемых штаммов, взбалтывали и переносили в специальные трубочки с последующим переносом в контейнеры для хранения в жидком азоте при -196°C [1, 4].

Консервация на природных субстратах: песок, почва-песок, цеолит. Кварцевый песок и цеолит в течение 3 сут промывали под проточной водой, периодически размешивая. Высушивали в сушильном шкафу при $100-150^{\circ}\text{C}$. Просеянный песок, смесь песка с почвой (10:1), цеолит помещали по 3 г в пробирки и дважды стерилизовали при 120°C в течение часа. В каждую пробирку закапывали 0,1 мл густой водной суспензии испытуемого штамма. Пробирки встряхивали и оставляли при комнатной температуре на длительное хранение [1, 4].

Лиофилизация: лиофилизировали культуры микроорганизмов, находящиеся в экспоненциальной фазе роста, выращенные на средах, соответствующих их физиологическим потребностям. Бактерии смывали в защитные среды и вносили в стерильные ампулы для лиофилизации по 0,3 мл густой суспензии. Исходный титр в ампуле составлял 10^9-10^{10} кл-ток/мл. Суспензии в ампулах замораживали в спирте при $-50-60^{\circ}\text{C}$, выдерживали при этой температуре в течение 15-20 мин с последующим высушиванием под вакуумом до остаточной влажности около 1% [1, 2, 4-8, 11, 13, 17].

Для поддержания коллекции митоспорических грибов использовали следующие условия и субстраты хранения и консервации штаммов: питательные среды (систематически-ми пересевами), природные субстраты (песок, смесь песок/почва 10:1, цеолит), криоконсервация в жидком азоте и в разных концентрациях глицерина (20, 40, 60, 100%) и при разной температуре (-10°C , -40°C , -60°C). Для хранения базидиальных грибов использовался метод периодических пересевов. Оптимальная среда для хранения – сусло-агар, температура культивации 24°C , с периодичностью пересевов 6 месяцев. Для МКБ использовали питательную среду МРС [16], для дрожжей – среду ГПА (глюкозо-пептонный агар), а для бактерий – МПА (мясо-пептонный агар).

Репродуктивные свойства штаммов проверяли следующим образом. Предварительно были разлиты в чашки Петри соответствующие среды: для грибов – агаризованная среда Чапека и сусло-агар, для дрожжей – глюкозо-пептонный агар, для МКБ-МРС, для бактерий – рыбо-пептонный агар. На подсушенные чашки переносили по 0,05 мл суспензии и ставили на инкубацию – дрожжи и грибы при 28°C , бактерии при $30-37^{\circ}\text{C}$. Через 3-14 сут проводили подсчет выросших колоний.

Результаты и обсуждение. Репродуктивные свойства некоторых культур митоспорических грибов (включая биодеградантов космической техники) при разных условиях консервации представлены в табл. 1. Выявлено, что большинство штаммов грибов, хранимых на естественных субстратах в течение 3-х лет, сохранили высокие репродуктивные свойства, за исключением некоторых: *Aspergillus terreus* ЦДМ 8114, *Penicillium funiculosum* ЦДМ 8120, *Trichoderma viride* ЦДМ 8125, *Penicillium melinii* ЦДМ 12035, *Ulocladium botrytis* ЦДМ 12037.

Установлены определенные различия в выживаемости и репродукции культур разных видов грибов при лиофилизации и хранении в жидком азоте. Сравнительная оценка испытанных методов позволяет заключить о больших преимуществах использования жидкого азота (табл.1).

Таблица 1. Сравнительная характеристика жизнеспособности и репродукции грибов при различных условиях консервации

Наименования и номера штаммов по ЦДМ	Репродукция штаммов спустя 3 года	Криоконсервация в жидком азоте в течение		Консервация в глицерине при разных концентрациях и температурах спустя 3 года, %							
			20	40	60	20	40	60	20	40	60

	Пе- сок	Почва/ песок	Цео- лит	3-х лет	4-х лет	-10°C				- 40°C	- 60°C
<i>Aspergillus niger</i> 8133	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>A. flavus</i> 8134	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. terreus</i> 8114	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. fumigatus</i> 12036	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Paecilomyces variotii</i> 8135	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>Penicillium aurantio-griseum</i> 8119	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. aurantiogriseum</i> 12040	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>P. aurantiogriseum</i> 12050	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>P. chrysogenum</i> 8128	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. chrysogenum</i> 12039	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. funiculosum</i> 8120	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. melinii</i> 12035	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Trichoderma viride</i> 8125	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Chaetomium globosum</i> 8117	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Cladadium botrytis</i> 12037	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-

Примечание: (-) – отсутствие роста.

Выявлены аналогичные данные при криоконсервации в глицерине. Большинство штаммов грибов характеризуется высокой выживаемостью и репродукцией при испытанных температурах и концентрациях глицерина. Сравнительно неблагоприятным является применение 100%-ного глицерина.

Результаты исследования жизнеспособности 32-х базидиальных грибов, хранимых под вазелиновым маслом в течение года, показали отсутствие репродуктивности у большинства штаммов, только у 3-х штаммов *Pleorotus ostreatus* наблюдали слабый рост. Таким образом, для поддержания коллекции базидиальных грибов приемлем метод периодических пересевов.

Известно несколько способов хранения культур МКБ: периодические пересевы, в 20%-ном растворе глицерина при -20⁰ С, под слоем вазелинового масла на агаризованной среде и в лиофильном состоянии. В литературе часто встречаются факты, свидетельствующие о нестабильности ряда свойств у МКБ [5, 11, 15].

С целью длительной консервации 110 штаммов МКБ и дрожжей разных видов были заложены на хранение под стерильное вазелиновое масло (4 -8⁰ С). После 5-ти лет хранения было установлено, что только 30% палочковидных форм МКБ сохранили жизнеспособность, а кокковидных – 60% (табл. 2).

Таблица 2. Репродуктивные свойства молочнокислых культур и дрожжей при хранении под слоем вазелинового масла

Наименования и номера штаммов по ЦДМ и др. Коллекциям	Репродукция штаммов спустя		Наименования и номера штаммов по ЦДМ и др. Коллекциям	Репродукция штаммов спустя	год	5 лет
	1 год	5 лет				
<i>Lactobacillus brevis</i> NCDO 477 <i>L. buchneri</i> VKM 1599 <i>L. casei</i> subsp. <i>Casei</i> NCDO 161 <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>Delbrueckii</i> VKM 1596 <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 1875 <i>Candida bogoriensis</i> 10007 <i>C. aaseri</i> 10001, <i>C. diffluentis</i> 10019 <i>Rhodotorula javanica</i> 10029 <i>Kluyveromyces fragilis</i> 10087 <i>K. lodderae</i> 10086, <i>K. delphensis</i> 10082 <i>Arxiozyma telluris</i> 10112	+++	++	<i>Lactobacillus acidophilus</i> MDC 10883, 10889, 10897 <i>L. casei</i> subsp. <i>Rhamnosus</i> MDC 10849 <i>L. plantarum</i> MDC 10882 <i>L. lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> CCM 1877 <i>Enterococcus durans</i> NCDO 596	++	-	

<i>Filobasidiella neoformans</i> 10159 <i>Debaryomyces venrijae</i> 10072					
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> VKM 535 <i>L. plantarum</i> NCDO 82 <i>Candida pintolopesii</i> 10137 <i>C. famata</i> 10119, <i>C. sake</i> 10053 <i>Rhodotorula muscorum</i> 10044 <i>Kluyveromyces marxianus</i> 10081 <i>Yarrowia lipolytica</i> 10033 <i>Clavispora lusitaniae</i> 10034	++	++	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>Paracasei</i> MDC 10898 <i>Candida blankii</i> 10006 <i>Pichia delftensis</i> 10167	+	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i> VKM 1660 <i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> VKM 574 <i>Pichia burtonii</i> 10197	++	+	<i>Lactobacillus acidophilus</i> MDC 9602, 9604, 9606, 9609, 9610, 9611, 10878, 10881 10883, 10884, 10885, 10887, 10889, 10892, 10893, 10894, 10895 <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> VKPM 7640 <i>L. fermentum</i> NCDO 215 <i>L. helveticus</i> VKM 842 <i>L. lactis</i> MDC 10881 <i>Streptococcus thermophilus</i> MDC 9608	+	-

Примечание: репродуктивность оценивалась по 3-х бальной системе: (-) – отсутствие роста,

*NCDO - National Collection of Dairy Organisms

VKM - All-Russian Collection of Microorganisms

VKPM - Russian National Collection of Industrial Microorganisms

CCM - Czechoslovak Collection of Microorganisms

Микроскопирование показало, что во время длительного хранения под вазелиновым маслом клетки МКБ подвергаются деформации, теряя свои естественные формы, утолщаются, что нельзя сказать о хранении их в глицерине (табл. 3).

Для выявления эффективности методов хранения культуры молочнокислых бактерий и дрожжей в течение 3-х лет поддерживали при – 20 °С в 20%-ном глицерине (табл.3).

К.В. ЧИТЧАН, М.А. КИНОСЯН, Н.Л. КАЗАНЧЯН, Н.С. ХАЧАТУРЯН, С.А. ГЕВОРГЯН, А.Г. АКОПЯН, Т.С. ДАВИДЯН

Таблица 3. Репродуктивные свойства молочнокислых бактерий и дрожжей при хранении под глицерином (-20 °С)

Наименования и номера штаммов по ЦДМ	Репродукция штаммов, спустя		Наименования и номера штаммов по ЦДМ	Репродукция штаммов, спустя	1 год	3 года
	1 год	3 года				
<i>Lactobacillus</i> sp. 10951 <i>Streptococcus</i> sp. 10850, 10857, 10864, 10865, 10867, 10868, 10869, 10870, 10871, 10957, 10960, 10962, 10964, 10965, 10968, 10970, 10976	+++	++	<i>Streptococcus</i> sp. 10854, 10856, 10861, 10872 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 9703 <i>Rodotorula mucilaginosa</i> 9768 <i>Cryptococcus humicolus</i> 10223	+	+	
<i>Streptococcus</i> sp. 10859, 10860, 10963, 10966, 10967, 10969, 10971, 10972	+++	++	<i>Lactobacillus</i> sp. 10873, 10874, 10950, 10952, 10954, 10961 <i>Candida albicans</i> 10032 <i>Pichia anomala</i> 10074 <i>Kluyveromyces marxianus</i> 10085	-	-	

<i>Streptococcus</i> sp. 10851, 10852, 10853, 10855, 10858, 10862, 10853, 10866, 10953, 10955, 10956, 10958, 10959, 10973, 10974, 10975	++	++			
---	----	----	--	--	--

Примечание: репродуктивность оценивалась по 3-х бальной системе: (-) – отсутствие роста.

Из литературных данных известно о сохранении репродуктивных свойств некоторых культур неспороносных бактерий, хранимых без пересевов под слоем вазелинового масла в течение 14 лет [7]. В связи с этим, представлял интерес проверить жизнеспособность и репродукцию культур микроорганизмов разных родов и видов при более продолжительном хранении. Проверили репродукцию 399 штаммов фитопатогенных бактерий после хранения в течение 25 лет под вазелино-вым маслом. Анализ данных показал, что около 25% изученных штаммов сохранили жизнеспособность. Относительно высокая репродуктивность отмечена у штаммов родов *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* (табл.4).

Таблица 4. Репродукция фитопатогенных бактерий после хранения в течение 25 лет под вазелиновым маслом

Наименование видов	Общее число изученных штаммов	Число штаммов после репродукции
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	56	36
<i>A. radiobacter</i>	1	1
<i>Erwinia carotovora</i>	84	8
<i>E. herbicola</i>	1	1
<i>Pseudomonas tabaci</i>	10	3
<i>P. lachrymans</i>	14	5
<i>P. agrobacters</i>	4	4
<i>Pseudomonas</i> sp.	21	8
<i>Rhodococcus fascians</i>	29	19
<i>Clavibacter michiganense subsp. michiganense</i>	11	0
<i>Xantomonas campestris</i>	3	0
<i>X. malvacearum</i>	4	0
<i>X. campestris</i> pv. <i>beticola</i>	140	2
<i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	20	4
<i>X. phaseoli</i>	1	1

Как видно из таблицы, только 3 вида *Clavibacter michiganense subsp. Michi-ganense*, *Xantomonas campestris*, *Xantomonas malvacearum* не репродуцировались. Исходя из этого, можно сделать вывод, что метод длительного хранения под вазелиновым маслом не пригоден для вышеуказанных видов.

Оценка репродуктивности спорообразующих и неспорообразующих бактерий при различных методах консервации (лиофилизация, под слоем вазелинового масла, в жидком азоте и в 20%-ном глицерине) после 5 лет хранения установила, что жизнеспособными оказались 90-95%, а на природных субстратах 60-75%. Жизнеспособность дрожжей сохраняется 70-85% (табл.3), метод лиофилизации для данной группы микроорганизмов не был испытан.

На основании сравнительной оценки испытанных методов можно заключить о преимуществе использования следующих методов консервации: лиофилизация → жидкий азот → глицерин → вазелиновое масло.

Проведенные исследования показали также очевидные различия в репродукции микроорганизмов, относящихся к различным родам и видам.

Авторы выражают благодарность Э.Африкяну за содействие.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аркадьева З.А. Методы хранения культур микроорганизмов. В кн.: Метаболизм микроорганизмов (под ред. Егорова Н.С.), М., Изд-во МГУ, 57-64, 1986.

2.
Бланков Б.И. Применение лиофилизации в микробиологии. М, Медгиз, 282с., 1961.
3.
Брюханов А.Л. Длительное хранение строго анаэробных микроорганизмов в глицерине. Прикладная биохимия и микробиология, 42, 2, 2000-2003, 2006.
4.
Герн Р. Хранение микроорганизмов. В кн.: Методы общей бактериологии (под ред. Ф. Герхардта), М., Мир, 512-534, 1983.
5.
Квасников Е.И., Нестеренко О.А. Молочнокислые бактерии и пути их использования, М., Наука, 389с., 1975.
6.
Куплетская М.Б. Результаты хранения лиофилизированных культур микроорганизмов в течение 25 лет. Микробиология, 56, 3, 488-491, 1987.
7.
Куплетская М.Б., Аркадьева З.А. Методы длительного хранения коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии Московского государственного университета. Микробиология, 66, 2, 283-288, 1997.
8.
Куплетская М.Б., Нетрусов А.И. Жизнеспособность лиофилизированных микроорганизмов после 50 лет хранения. Микробиология, 80, 6, 842-846, 2011.
9.
Лозина-Лозинский Л.К. Очерки по криобиологии. Адаптация и устойчивость организмов и клеток к низким и сверхнизким температурам. Л., Наука, 288с., 1972.
10.
Сидякина Т.М. Консервация микроорганизмов в коллекциях культур. Консервация генетических ресурсов. Методы. Проблемы. Перспективы. Пушкино, 81-159, 1991.
11.
Стоянова Л.Г., Аркадьева З.А. Сравнение способов хранения молочнокислых бактерий. Микробиология, 69, 1, 98-104. 2000.
12.
Шмидт П.Я. Анабиоз. М., Л., Изд-во АН СССР, 436с., 1955.
13.
Фатеева М.В. Методы хранения коллекционных культур дрожжей. М., Наука, 55-90, 1967.
14.
Juarez T., Bru E., Martos G., Nader-Macias M.E. Stability of freeze-dried vaginal *Lac-tobacillus* strains in the presence of different lyoprotectors. Can. J. Microbiol., 55, 5, 544-552, 2009.
15.
Maintenance of microorganisms and cultured cells. A manual of laboratory methods (Eds. Kirsop B.E., Doyle A.), London, New York, Academ. Press, 308p., 1991.
16.
Man J.C. de, Rogosa M., Sharpe M.E. J. Appl. Bacteriol., 23, 130, 1960.
17.
Santivarangkna C., Kulozik U., Foerst P. Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures. Biotechnol. Prog., 23, 2, 302-315, 2007.
18.
Strasser S., Neureiter M., Geppl M., Braun R., Danner H. Influence of lyophilization, fluidized bed drying, addition of protectants, and storage on the viability of lactic acid bacteria. J. Appl. Microbiol., 107, 1, 167-177, 2009.

Поступила 11.11.2014



Биолог. журн. Армении, 2 (67), 2015

**ПРЕДСТАВЛЕННОСТЬ РЕДКИХ ЭНДЕМИЧНЫХ ВИДОВ
РАСТЕНИЙ АРМЕНИИ В ГЕРБАРИИ
ИНСТИТУТА БОТАНИКИ НАН РА (ERE).
ЧАСТЬ II. ИНФОРМАЦИЯ ПО ОТДЕЛЬНЫМ ВИДАМ
(сем. ALLIACEAE – ASTERACEAE)**

А.М. АЙРАПЕТЯН, Г.М. ФАЙВУШ, А.Г. МУРАДЯН

*Институт ботаники НАН РА
alla.hayrapetyan.63@gmail.com, gfayvush@yahoo.com*

Статья является второй из серии статей, посвященных изучению представленности редких эндемичных, включенных в Красную книгу растений Армении (Tamanyan & al., 2010) видов в гербарии Института ботаники НАН РА (ERE). Подробно охарактеризованы отдельные виды растений, относящиеся к семействам Alliaceae Borkh., Apiaceae Lindl. и Asteraceae Bercht. & J. Presl.

Эндемик – Красная книга растений Армении – Alliaceae – Apiaceae – Asteraceae

Ներկայացված հոդվածը ՀՀ ԳԱԱ Բուսաբանության ինստիտուտի հերբարիումում (ERE) Հայաստանի բույսերի Կարմիր գրքում (Tamanyan & al., 2010) թվարկված էնդեմիկ տեսակների ներկայացվածության ուսումնասիրմանը նվիրված հոդվածների շարքի երկրորդն է: Մանրամասն բնութագրվում են Alliaceae Borkh., Apiaceae Lindl. և Asteraceae Bercht. & J. Presl. ընտանիքներին պատկանող առանձին տեսակները:

Էնդեմիկ – Հայաստանի բույսերի Կարմիր գրք – Alliaceae – Apiaceae – Asteraceae

This is the second article in the series of articles devoted to investigation of representation of endemic plant species included in the Red Data Book of plants of Armenia (Tamanyan & al., 2010) taxa deposited in the Herbarium of the Institute of Botany NAS RA. Detailed characterizations of representatives of *Alliaceae* Borkh., *Apiaceae* Lindl. and *Asteraceae* Bercht. & J. Presl. families are given.

Endemics – Red Data Book of plants of Armenia – Alliaceae – Apiaceae – Asteraceae

Сем. Alliaceae Borkh.

1. *Allium struzlianum* Ogan. Распространение¹: произрастает в Ширакском (окрестности Джаджурского перевала и в окрестностях сел Цамакасар и Крашен) и Ереванском (окрестности села Ерасх) флористических районах. Ареал вида дизъюнктивный, известны две субпопуляции, расстояние между которыми более

¹ Здесь и далее – данные взяты из Красной Книги Армении [4]

100 км. В Красную книгу растений Армении [4] вид включен как уязвимый (категория VU).

ПРЕДСТАВЛЕННОСТЬ РЕДКИХ ЭНДЕМИЧНЫХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ АРМЕНИИ В ГЕРБАРИИ ИНСТИТУТА БОТАНИКИ НАН РА...

В гербарии ERE данный вид представлен 14 образцами, среди которых отмечено 9 типовых экземпляров²: голотип (ERE 11618), 2 изотипа (ERE 116184 и 116186) и 6 паратипов (ERE 125229, 146501, 146502, 146503, 146504, 116187).

Первые образцы по данному виду были собраны А.А. Ахвердовым, Н.В. Мирзоевой, П.П. Гамбаряном 25.05.1960г. (Араздаян, обочина шоссе), а также Э.Ц. Габриэлян 26.05.1960г. на Сарай-Булагском (Урцском) хребте. В последний раз сборы проводились в 2004 году (коллекторы: Е. Vitek, К. Tamanyan, G. Fayvush, М. Oganessian, А. Ter-Voskanyan).

Субпопуляция вида в окрестностях села Крашен на Ширакском хребте в районе Джаджурского перевала расположена на одной из Ключевых ботанических территорий Армении [1, 2].

Для сохранения вида необходимо проводить регулярные наблюдения с целью мониторинга состояния всех субпопуляций и создание особо охраняемой природной территории на Ширакском хребте в окрестностях Джаджурского перевала.

Сем. *Apiaceae* Lindl.

2. *Bupleurum koso-poljanskyi* Grossh. Распространение: произрастает в двух (Гегамский и Иджеванский) флористических районах. В Красную книгу растений Армении [4] вид включен как уязвимый (категория VU). Ареал вида фрагментирован, не образует крупных густых популяций.

В гербарии ERE данный вид представлен 24 образцами. Самый первый сбор в гербарии ERE принадлежит А.А. Гроссгейму, автору нового вида (*Bupleurum koso-poljanskyi* sp.n. 14.07.1919) (Isotypus) (ERE 24118). Из наиболее ранних отметим также сборы А.Б. Шелковникова (29.08.1922). В дальнейшем сборы проводились регулярно вплоть до 2007 г.

Одна из субпопуляций вида произрастает на территории Национального парка “Дилижан”, с целью сохранения вида необходим регулярный мониторинг состояния его субпопуляций.

3. *Seseli leptocladum* Woronow. Распространение: Дарелегисский флористический район (окрестности сел Арени и Хачик). Известна всего одна популяция вида вблизи границы с Нахичеванской республикой. В Красную книгу растений Армении [4] вид включен как находящийся под угрозой (категория EN).

В гербарии ERE по данному виду отмечено 10 образцов, типовых образцов не имеется. Первые экземпляры по данному виду были собраны А.А. Федоровым 01.08.1940г. (In collibus aridis inter r. Chaczik et Ausch in distr. Daralagez (ERE 28258)), а в дальнейшем сборы проводились лишь до начала 80-х годов XX столетия. Известная популяция расположена на территории охраняемого ландшафта “Гнишик”, необходим мониторинг ее состояния.

4. *Smyrniopsis armena* Schischk. Произрастает только в Дарелегисском флористическом районе (Селимский перевал, Джермук, Гетикванк, Ахавнадзор, Спитакавор, Цахац Кар). Большинство субпопуляций вида связано с историческими памятниками (церкви, монастыри, каравансарай). В Красную книгу растений Армении [4] вид включен как находящийся под угрозой (категория EN).

² В связи с тем, что с 2014 года в Отделе систематики и географии высших растений Института ботаники НАН РА начаты работы по инвентаризации типовых образцов в гербарии ERE (руководитель д.б.н. Оганесян М.Э.), в настоящей и последующих статьях этой серии будут приводиться обновленные данные по числу типовых образцов исследуемых видов.

В гербарии ERE данный вид представлен 32 экземплярами, типовых образцов не имеется. Первые образцы были собраны И. Новопокровским в окрестностях Селимского перевала (ERE 25155, 25156), а последние сборы проводились И.Г. Аревшатын, А.А. Нерсисян 19.08.2011 (ERE 183206).

Практически ежегодно проводятся наблюдения за состоянием популяции в окрестностях “каравансарая” на Селимском перевале (последние наблюдения проведены в 2014г.). В целом большинство субпопуляций находятся в хорошем состоянии.

Необходимо продолжение мониторинга состояния популяции.

Сем. *Asteraceae* Bercht. & J.Presl

5. *Centaurea alexandrii* Bordz. Произрастает только в Мегринском флористическом районе в долине р. Аракс (Мегри, Алдара, Шванидзор, Прнадзор). В Красную книгу растений Армении [4] вид включен как находящийся под угрозой (категория EN).

В гербарии ERE данный вид представлен 14 образцами, среди которых отмечено 2 типовых экземпляра: голотип (ERE 8361) и изотип (ERE 8362).

Первый сбор в гербарии ERE принадлежит А.Б. Шелковникову и Э.Н. Карамурзе (07.07.1929), и в том же году был определен Е.И. Бордзиловским как новый вид (*Centaurea alexandrii* Bordz.). Вид неоднократно собирался вплоть до 90-х годов прошлого столетия, более поздние сборы в гербарии ERE отсутствуют. Это, очевидно, связано с тем, что популяция произрастает в пограничной зоне, в которой в настоящее время ботаническая работа очень ограничена правилами и нормами.

В 2009 г. в Мегринском районе был организован Национальный парк “Аревик”, однако его территория не охватывает места произрастания данного вида. Было бы желательно расширить территорию Национального парка с тем, чтобы хотя бы в нескольких местах он охватывал прибрежную полосу реки Аракс. Также необходимо выяснение современного состояния популяции вида, а в дальнейшем регулярный мониторинг ее состояния.

6. *C. arvensis* (Czer.) Wagenitz (= *Sosnovskya arvensis* Czer.). Произрастает в двух флористических районах – Ереванском (Веди, Тигранашен, ущелье Джандам Дара) и Дарелегисском (окрестности Ехегнадзора). В Красную книгу растений Армении [4] вид включен как находящийся под угрозой (категория EN).

В гербарии ERE вид представлен 11 образцами, среди которых отмечен 1 типовой экземпляр (изотип), первоначально определенный авторами сбора Н.Н. Цвелевым и С.К. Черепановым как *Sosnovskya arvensis* Czer. (07.08.1957), а спустя 11 лет был переопределен Э.Ц. Габриэлян (ERE 81842).

Первые образцы по данному виду были собраны А.А. Ахвердовым и Н.В. Мирзоевой в Дарелегисе в 1950-е годы (ERE 130508, 130509, 130510, 130511, 130512), а последние – сотрудниками отдела систематики Института ботаники НАН РА в 1977 году.

Фактически современное состояние субпопуляций этого вида неизвестно, необходимы специальные полевые исследования с целью оценки их состояния и организация дальнейшего мониторинга. Необходимо учесть, что одна из субпопуляций попадает на территорию охраняемого ландшафта «Гнишик», что может позволить организовать ее более действенную охрану.

7. *C. takhtajanii* Gabrielian & Tonjan. Узколокальный эндемик Армении, известна всего одна немногочисленная популяция в Ширакском флористическом районе в окрестностях сел Акко, Каракерт, Заринджа, Цамакасар, Ацашен и на го-

ре Артени, при этом площадь обитания вида менее 8 км². В Красную книгу растений Армении [4] вид включен как находящийся в критическом состоянии (категория CR).

В гербарии ERE вид представлен 20 образцами, среди которых 8 типовых экземпляров: голотип (ERE 142820), 3 изотипа (ERE 14282, 142822, 148714) и 4 паратипа (ERE 12178, 125359, 125414, 125416).

Первые образцы были собраны А.К. Магакяном в 1934г. (Алагез, ЮЗ склон, г. Заринджа) и первоначально были определены Д.И. Сосновским в 1935г. как *Centaurea boissieri* D. Sosn. (ERE 12178). Вид описан в 1984 г. как *Centaurea takhtadjanii* Gabrielian & Tonjan. В последний раз сборы проводились в 1995г. (ERE 143279).

Гора Артени выделяется в качестве Ключевой ботанической территории [2], необходимо организовать здесь ООПТ с целью сохранения целого комплекса редких видов и экосистем. Конкретно по виду *C. takhtadjanii* необходимо уточнение современного состояния популяции и дальнейший мониторинг.

8. *C. vavilovii* Takht. et Gabrielian. Узколокальный эндемик Армении, известна одна популяция в Ереванском флористическом районе (Урцский хребет). В Красную книгу растений Армении [4] вид включен как находящийся в критическом состоянии (категория CR).

В гербарии ERE данный вид представлен 11 образцами, среди которых отмечены следующие типовые экземпляры: голотип (ERE 132091a, 132091b), изотип (ERE 157006a, 157006b) и 5 паратипов (ERE 132091, 132092, 132184, 132185, 132186). Сборы по данному виду в гербарии ERE представлены 1985-1986 годами, в последние годы (2013-2014) в ходе полевых работ оценивалось состояние некоторых субпопуляций и проводилось их фотографирование.

Необходим дальнейший мониторинг состояния популяции.

9. *Cousinia fedorovii* Takht. Эндемик Севанского флористического района, встречается в основном на Арегунийском побережье озера Севан, включая мыс Арданиш. Еще одна субпопуляция была зарегистрирована на мысе Норатуз в 1923 г., однако позднее здесь вид не собирался. В Красную книгу растений Армении [4] вид включен как находящийся под угрозой (категория EN).

В гербарии ERE данный вид представлен 20 образцами, среди которых отмечено 7 типовых экземпляров: голотип (ERE 25767) и 6 паратипов (ERE 3162, 3163, 22518, 22523, 25764, 25765). При этом первый паратип – экземпляр, собранный А.А. Гроссгеймом впервые в Армении (25.07.1919). Среди первых коллекторов следует отметить также О.М. Зедельмейер (А. Grossheim et O. Zedelmejer, 26.07.1923), А.Б. Шелковникова и Э.Н. Кара-Мурзу (02.07.1927), А.К. Магакяна (05.07.1934). Хотя последние сборы по виду осуществлены в середине 90-х годов прошлого столетия, регулярные наблюдения последних лет показали, что состояние популяции удовлетворительное. Вид произрастает на территории Национального парка “Севан”, в том числе и на заповедной территории Арданиш.

Необходимо продолжение регулярного мониторинга состояния всех частей популяции.

10. *Grossheimia caroli-henrici* (Gabrielian et Dittr.) Gabrielian (=Centaurea caroli-henrici Gabrielian & Dittrich). Узколокальный эндемик Дарелегисского флористического района, известна только одна очень маленькая популяция в окрестностях Джермука. В Красную книгу растений Армении [4] вид включен как находящийся в критическом состоянии (категория CR).

В гербарии ERE данный вид представлен 3 образцами, среди которых отмечен 1 типовой (*Centaurea caroli-henrici* Gabrielian & Dittrich) (Isotypus) (ERE 142812). Образцы вида собирались в течение 1989-1997 годов, позднее (последний

раз в 2013г.) проводились обследования состояния популяции с фотографированием без сбора гербарного материала, чтобы не угрожать и так очень малочисленной популяции.

Необходимо продолжение регулярного мониторинга состояния популяции.

11. *Gundelia aragatsi* Vitek & al. Подробные сведения относительно данного вида представлены в первой статье этой серии [1].

11a. *G. aragatsi* ssp. *aragatsi*. Данный типовой подвид в Армении встречается на юго-восточных склонах горы Арагац в окрестностях села Байсиз. Состояние популяции удовлетворительное. Необходим мониторинг ее состояния.

До последнего времени этот подвид в гербарии ERE был представлен 7 типовыми образцами (Paratypus), из них 4 экз. собраны 05.06.2006г. (ERE 188284, 188285, 188286, 188287) и один – 10.06.2009г. (ERE 185094). Имеется также 2 отдельных образца листового материала, помещенного в силикагель с целью проведения молекулярно-генетических исследований (ERE 188283, 185095).

В конце 2014г. гербарий по данному виду был пополнен еще 8 образцами, определяемыми ранее как вид *G. tournefortii* L., при этом первые сборы были проведены А.А. Гроссгеймом, а также А.Б. Шелковниковым и Э.Н. Кара-Мурзой в 20-х годах прошлого века (ERE 3424, 6507). Сборы остальных шести образцов датируются 50-80 годами XX века.

11b. *G. aragatsi* ssp. *steineri* Vitek & al. В Армении известна одна популяция этого подвида в Дарелегисском флористическом районе в окрестностях села Арпи. Популяция произрастает на небольшой территории, но очень плотная и проявляет тенденцию к расширению своей площади. Необходим мониторинг ее состояния.

В гербарии он представлен 3 типовыми экземплярами, из них один – голотип (ERE 185092) и два изотипа (ERE 185090, 185091), дата сбора – 01.06.2009г.

12. *Psephellus debedicus* (Gabrielian) Gabrielian (= *Centaurea debetica* Gabrielian). Эндемик Северной Армении, известный только из Иджеванского флористического района (окрестности Иджевана, Севанский перевал, Дебет, Дзорает, Дсех). Ареал вида дизъюнктивный, основная часть популяции произрастает в бассейне р. Дебед. В Красную книгу растений Армении [4] вид включен как находящийся под угрозой (категория EN).

В гербарии ERE вид представлен 18 образцами, типовых образцов нет (утрачены?). Первые образцы были собраны Э.Ц. Габриэлян и В.Е. Аветисян в 1960 г. (ERE 148863, 148982), а последние сборы осуществлены М.Э. Оганесян в 1990 г. (ERE 148937).

Необходим мониторинг состояния популяции.

13. *Psephellus zangezuri* Sosn. Эндемик Зангезурского флористического района, произрастающий в бассейнах рек Воротан и Вохчи. В Красную книгу растений Армении [4] вид включен как находящийся под угрозой (категория EN).

В гербарии ERE вид представлен 13 образцами, среди которых 2 типовых экземпляра: голотип (ERE 149552) и топотип (ERE 149553). Первые образцы были собраны 10.08.1944г. П.Д. Ярошенко (Holotypus), а также П.Д. Ярошенко и А.В. Ивановой (ERE 31090), которые в 1945 г. были определены Д.И. Сосновским как новый вид (*Psephellus zangezuri* D. Sosn.). При этом первый экземпляр принимается в качестве голотипа. В дальнейшем сборы проводились регулярно вплоть до 1987 года. В 2010 г. вид был обнаружен также и на территории Нагорно-Карабахской республики (Кашатахский район, окр. Урекан, на травянистых склонах, сб. Балаян К.В.) (ERE 180955), что означает расширение ареала вида за пределы Армении.

Состояние популяции удовлетворительное, необходимо продолжение исследований по уточнению его ареала.

14. *Rhaponticoides hajastana* (Tzvelev) Agababian et Greuter (= *Centaurea hajastana* Tzvelev). Эндемик Ширакского флористического района, произрастает в окрестностях сел Джаджур, Ани, Баграван, Саракап, Цамакасар, Ацашен и др. Вид приурочен в основном к степным местообитаниям, которые в настоящее время очень сильно трансформированы (распаханы под сельскохозяйственные культуры, подвергаются интенсивному выпасу). В результате, занимая довольно большую площадь, ареал вида сильно фрагментирован, субпопуляции представлены небольшим числом экземпляров, располагаясь на межах и сильно каменистых участках. В Красную книгу растений Армении [4] вид включен как находящийся под угрозой (категория EN).

По числу образцов (38) один из самых хорошо представленных видов в гербарии ERE. Самый первый экземпляр в гербарии ERE, собранный в Джаджуре 23.07.1931 г. (Holotypus), принадлежит Д.И. Сосновскому (ERE 40533). Последующие образцы были собраны Ш.В. Аслanian лишь 20 лет спустя, в 1950 году (ERE 55708, 55709, 55710). Последние сборы по данному виду проведены 03.07.2007 г. (ERE 180418). Позднее проводились регулярные наблюдения за состоянием популяции.

Необходим регулярный мониторинг состояния популяции.

15. *Rhaponticoides tamanianae* (Agababian) Agababian et Greuter (= *Centaurea tamanianae* Agababian). Вид представлен двумя субпопуляциями, разделенными большим расстоянием – одна в Ширакском, вторая в Дарелегисском флористическом районах. Популяция в Ширакском флористическом районе очень немногочисленна, произрастает на Ширакском хребте в окрестностях Джаджурского перевала. Этот участок выделяется как одна из Ключевых ботанических территорий Армении [1, 2]. В Дарелегисском флористическом районе вид был известен только из окрестностей села Хачик, а в последние годы (2012-2014) было обнаружено еще несколько мест произрастания вида в окрестностях сел Мозров и Гнишик. В Красную книгу растений Армении [4] вид включен как находящийся в критическом состоянии (категория CR).

В гербарии ERE данный вид представлен 24 образцами, среди них 8 типовых образцов: голотип (ERE 134045), изотип (ERE 150333), 2 паратипа (ERE 134047, 134046) и 4 изопаратипа (ERE 150618, 150620, 150621, 150622). Основное число сборов относится к 80-90-м годам прошлого столетия, а три отмечены 2012-м годом (ERE 186847, 186848, 186849).

Дарелегисская субпопуляция произрастает на территории охраняемого ландшафта “Гнишик” и нуждается в мониторинге состояния популяции. Необходимо выделение особо охраняемой территории и организация ее охраны.

16. *Sonchus araraticus* Nazarova et Barsegian. Узколокальный эндемик, произрастающий на засоленных болотах в окрестностях поселка Арарат. В Красную книгу растений Армении [4] вид включен как находящийся в критическом состоянии (категория CR).

В гербарии ERE данный вид представлен 15 образцами, среди которых отмечено 10 типовых экземпляров: голотип (ERE 116863), изотип (ERE 117190) и 8 паратипов (ERE 116864, 116865, 116866, 116869, 116901, 116910, 116911, 116927). Первые образцы по виду были собраны А.М. Барсегяном в 1961 году (ERE 116865). Подавляющее большинство гербарных образцов датируется 60-80 годами прошлого века, а в последний раз сборы проводились в 2007 г. (ERE 185075). Место произрастания вида выделено как памятник природы, однако реальной охраны экосистемы засоленных болот не существует. Необходимо организовать действенную охрану этой территории, где произрастает целый комплекс очень редких видов.

17. *Tragopogon armeniacus* Kutath. Эндемик Ширакского флористического района, известны локалитеты в окрестностях Джаджурского перевала и сел Спандарян, Агин, Баграмян. В Красную книгу растений Армении [4] вид включен как находящийся под угрозой (категория EN).

В гербарии ERE данный вид представлен 13 образцами, типовых образцов не имеется. Первые образцы были собраны И.Г. Аревшатын в 1978 г. в окрестностях села Агин Анийского района (ERE 132918), а в последний раз сборы проводились в 2006 году (ERE 180628).

Необходим мониторинг состояния популяции.

Исследование выполнено при финансовой поддержке ГКН МОН РА в рамках научного проекта № SCS "13-1F093".

ЛИТЕРАТУРА

1. Айрапетян А.М., Файвуш Г.М., Мурадян А.Г. Представленность редких эндемичных видов растений Армении в гербарии Института ботаники НАН РА (ERE). Часть I. Общие сведения. Биолог. журн. Армении, 67, 1, с. 80-85, 2015.
2. Таманян К.Г., Файвуш Г.М. О Ключевых ботанических территориях в Армении. Флора, растительность и растительные ресурсы Армении, 17. Ереван, с. 78-81, 2009.
3. Asatryan A., Fayvush G. Habitats of Armenia: the classification scheme. Yerevan: AG Print, 16 p., 2013.
4. Tamanyan K., Fayvush G., Nanagyulyan S., Danielyan T. (eds.). The Red Data Book of plants of RA. Yerevan: Zangak, 598 p., 2010.

Поступила 05.11.2014



Biolog. Journal of Armenia, 2 (67), 2015

THE COMPARATIVE ESTIMATION OF BLOOD HEMATOLOGICAL PARAMETERS FOR HOLSTEIN, SWISS AND SIMMENTAL COWS IMPORTED FROM GERMANY AND AUSTRIA TO ARMENIA

NAVASARDYAN D.S.

*Armenian National Agrarian University
davitnav@gmail.com*

The aim of this assessment was to detect the deviations from standards of the hematological parameters for Swiss, Simmental and Holstein cows, imported from Germany and Austria to Armenia. The results of our research showed that blood hematological parameters in all tree breeds of cows was in reference ranges, which justifies normal adaptation process.

Blood – erythrocytes – hemoglobin – leucocytes – new climate conditions

Ուսումնասիրության նպատակն է եղել Ավստրիայից և Գերմանիայից Հայաստանի Հանրապետություն ներկրված հոլշտին, շվից և սիմենթալ ցեղերի կովերի հեմատոլոգիական ցուցանիշների համեմատական ուսումնասիրությունը՝ բնակլիմայական նոր պայմաններում: Հետազոտության համար ձևավորված 3 փորձնական խմբերի կովերը ընտրվել են համանման մեթոդով: Հետազոտության արդյունքները եղել են հետևյալը. բոլոր երեք ցեղերի մոտ հեմատոլոգիական ցուցանիշները գտնվել են նորմայի սահմաններում, որը փաստում է ներկրված կենդանիների հարմարվողականության նորմալ ընթացքը:

Արյուն – էրիթրոցիտ – հեմոգլոբին – լեյկոցիտ – կլիմայական նոր պայմաններ

Изучались изменения гематологических показателей коров голштинской, симментальской и швицкой пород в новых климатических условиях, завезенных из Австрии и Германии в Армению.

Для исследования трех опытных групп коровы голштинской, симментальской и швицкой пород были выбраны аналогичным методом. Результаты исследований были следующие: гематологические показатели у всех трех пород были в пределах нормы, что свидетельствует о нормальной адаптации данных пород к местным климатическим условиям.

Кровь – эритроциты – лейкоциты – гемоглобин – климатические новые условия

The present study aim's at investigating various hematological values of Holstein, Swiss and Simmental cows breed, which are imported from Germany and Austria to Armenia.

Some essential blood parameters can be indicators of the physiological, nutritional, metabolic, clinical and adaptation status of farm animals. Blood has a very important role for life nutritional processes and gives opportunity to estimate animals adaptation process in a new climate conditions.

At the same time laboratory testing is an important tool that helps practitioners monitor the changes of cows' health both: individual and herd levels.

The knowledge of hematological values is useful in diagnosing various pathological and metabolic disorders.

In clinical diagnostics, information about changes of white blood cell count is very important. White cells are the basic cells of the immune system, which determines normal body function. If erythrocytes and leucocytes are high in blood, this is an evidence for good adaptation abilities of animals [2]. For observing animals adaptation process many scientists have investigated animal blood hematological parameters [3-5, 7].

The norms of blood hematological parameters are: Hemoglobin (HGB) 90-150 g/l, erythrocytes (RBC) $5-10 \times 10^{12}/L$, leucocytes (WBC) $4-12 \times 10^9/l$ [4], mean corpuscular volume (MCV) 40-60 fl, mean corpuscular hemoglobin (MCH) 11-17 pg., mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) 30-36 g/l [6]. Blood hematological parameters of cows depends on many factors and can be differ depends on breed, sex, age, feeding and keeping conditions and animal's physiological situation.

Materials and methods. The study was carried out in third lactation ages at Holstein, Simmental and Swiss cows imported from Europe (Austria and Germany) to the "Agroholding Armenia" LLC in Spitak, Armenia. This animals was imported within "Cattle breeding development program in Republic of Armenia in 2007-2015". Estimated animals were kept in a free stall barn under the same keeping and feeding conditions in whole estimated periods. The animals are chosen using analog method.

Blood samples were taken from jugular vein in vacuum tubes, the heads number of estimated animals was fifteen. Cows blood hematological parameters were analyzed with "ABX Pentra 60" devices in "HELLIOS" medicine center and we determined the following parameters: Hemoglobin (HGB) g/l, erythrocytes or red blood cell (RBC), leucocytes or white blood cell (WBC) $10^9/l$, mean corpuscular volume (MCV) fl, mean corpuscular hemoglobin (MCH) pg., mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) g/l.

Results and Discussion. The results of our research are presented in the tab. 1. It is clear from table one that erythrocytes (RBC) count in Holstein and Simmental cows is $7,2 \times 10^{12}/l$. By comparing this parameter with that of Holstein and Simmental with Swiss cows, the result is as follows: red blood cells count in Holstein and Simmental cows' blood samples exceeds the Swiss cows' by $0.9 \times 10^{12}/l$ or by 14.3 %: There were significant differences ($P>0,98$) between the results of RBC in Holstein and Simmental cows. The next parameter that has estimated is hemoglobin, which is the highest in Simmental cows (89.0 g/l), which exceeds Simmental's hemoglobin count by 7.8 g/l and by 12.3 g/l Holstein's hemoglobin count. If compare Holstein and Swiss cows' hemoglobin count, we will see that Swiss cows exceed Holstein cows' by 4.5 g/l (5.5 %).

As for MCHC, the highest content of MCHC is observed in Swiss cows blood making up 24,6 g/l, which exceeds Holstein's by 0.8 g/l (3.25 %) and Simmental's by 0.3 g/l (1,2 %). MCH parameter is relatively higher in Swiss cows by 17 % or by 2.2 pg. than Holstein MCH parameter and by 4.6 % or by 0.6 pg than Simmental's MCH parameter. In this parameters no significant differences are observed.

What about white blood cells or leucocytes, it needs to mention that Holstein cows are leader comparing with coeval Swiss and Simmental cows. As it is mentioned the Holstein WBC count is the highest and exceeds the Swiss cows by 31.5 % or by $3.4 \times 10^9/l$ and and by 15.7 % or by 1.7×10^9 from Simmental. In this parameter there is no significant differences observed. According to the results of our research the highest level of hematocrit has been in Simmental cows' blood (36.5 %), which is by 3.5 higher than Swiss and by 4.3 higher than Holstein's. In this parameter medium level belongs Swiss cows (33 %), which is only by 0,8 more than Simmental cows' blood hematocrit. In this parameter there is no significant differences observed.

Table 1. Hematological parameters in third lactation Holstein, Swiss and Simmental cows

Hematological parameters	Biological parameters	Holstein	Swiss	Simmental
Red blood cell (RBC), $10^{12}/l$	Lim	6,9-7,3	5,87-6,53	6,28-8,22
	M $\pm$ m	7,2 $\pm$ 0,1	6,3 $\pm$ 0,2	7,23 $\pm$ 0,56
	Cv %	2,9	5,3	13,42
	σ	0,2	0,3	0,97
Hemoglobin (HGB), g/l	Lim	67-89	70-92	78,0-102,0
	M $\pm$ m	76,7 $\pm$ 6,5	81,2 $\pm$ 5,4	89 $\pm$ 7
	Cv %	14,7	13,4	13,6
	σ	11,2	10,9	12,1
Mean corpuscular hemoglobin concentration, (MCHC), g/l	Lim	23,5-24,1	23,8-25,3	23,7,1-24,9
	M $\pm$ m	23,8 $\pm$ 0,2	24,6 $\pm$ 0,3	24,3 $\pm$ 0,3
	Cv %	1,3	2,8	2,5
	σ	0,3	0,7	0,6
White blood cell (WBC), $10^9/l$	Lim	5,8-18,8	4,8-9,8	9,1
	M $\pm$ m	10,8 $\pm$ 4,0	7,4 $\pm$ 1,1	9,1 $\pm$ 0,4
	Cv %	64,4	28,0	8,6
	σ	7,0	2,1	0,8
Hematocrit (Hct), %	Lim	27,8-37,5	29,4-36,9	32-42,8
	M $\pm$ m	32,2 $\pm$ 2,8	33,0 $\pm$ 2,1	36,5 $\pm$ 3,2
	Cv %	15,2	12,5	15,3
	σ	4,9	4,1	5,6
Mean corpuscular volume (MCV), fl	Lim	38-54	38-54	48-52
	M $\pm$ m	45 $\pm$ 4,7	52,5 $\pm$ 3,2	50,3 $\pm$ 1,2
	Cv %	18,2	12,3	4,1
	σ	8,2	6,4	2,1
Mean corpuscular hemoglobin (MCH), pg	Lim	9,2-12,9	10,7-14,6	12,1-12,5
	M $\pm$ m	10,7 $\pm$ 1,1	12,9 $\pm$ 0,9	12,3 $\pm$ 0,11
	Cv %	18,0	13,4	1,6
	σ	1,9	1,7	0,2

According to the results of our research the highest level of hematocrit has been in Simmental cows' blood (36.5 %), which is by 3.5 higher than Swiss and by 4.3 higher than Holstein's. In this parameter medium level belongs Swiss cows (33 %), which is only by 0,8 more than Simmental cows' blood hematocrit. In this parameter there is no significant differences observed.

Comparing analysis of three breeds of Holstein, Swiss and Simmental cows' blood parameters show that MCV is higher in Swiss cows, followed by Simmental and then Holstein cows.

The results of our research that are carried out in "Agroholding Armenia" LLC, show Holstein and Simmental cows have higher RBC count in blood than in Swiss cows. The hemoglobin count comparatively is higher in Swiss cows' blood and WBC is higher cows'. Higher hematocrit parameters are observed in Swiss cows' blood. MCH and MCHC parameters are higher in Swiss cows.

According to the results of our study we can say that hematological parameters in Holstein, Swiss and Simmental cows are within norm limits, which justifies that three breeds of cows demonstrate sufficient adaptation in new climate and keeping conditions.

REFERENCES

1. Авзалов Р.Х., Ганиев С.Б., Садыкова Э.О. Гематологический статус и молочная продуктивность коров симментальской породы в условиях Башкирского Зауралья. Фундаментальные основы научно-технической и технологической модернизации апк (фонтитм-апк-13), с. 459-462, 2013.

2. *Василисин В.В., Соколов В.В., Голубцов А.В., Мистюкова О.Н., Кузьмичёва В.Н., Минченко Л.П.* Физиолого-биохимические показатели крови коров красно-пестрой породы и коров симментальской породы австрийской селекции. Вестник Воронежского государственного аграрного университета, 1, с. 58-63, 2009.
3. *Шевхужев А.Ф., Смакуев Д.Р., Меремиаова Э.А.* Продуктивность и гематологические показатели крови коров симментальской породы австрийской селекции различных внутрипородных типов. Фундаментальные исследования, 9, с. 602-605, 2014.
4. *Колобков Д.М., Герман Н.В., Шепелева Т.А.* Морфобиохимические аспекты адаптации импортированного крупного рогатого скота симментальской и голштинско-фризской пород в условиях Южного Урала. Аграрный вестник Урала, 8, с. 22-23, 2011.
5. *Сазонов Н.Н., Третьяков И.С.* Адаптационные способности коров симментальской породы австрийской селекции в условиях центральной Якутии, Вестник северо-восточного федерального университета им. М.К. Аммосова, 2, с. 26-31, 2013.
6. *Constantin Găvan, Costică Retea, Vergil Motorga.* Changes in the Hematological Profile of Holstein Primiparous in Periparturient Period and in Early to Mid Lactation. Animal Sciences and Biotechnologies, 43, 2, p. 244-246, 2010.
7. *Mirzadeh Kh., Tabatabaei S., Bojarpour M. and Mamoei M.* Comparative Study of Hematological Parameters According Strain, Age, Sex, Physiological Status and Season in Iranian Cattle. Journal of Animal and Veterinary Advances, Issue 16, p. 2123-2127, 2010.

Received on 18.02.2015



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 2(67), 2015

ՌՈՄԱՆՈՎՅԱՆ ԵՎ ՀԱՅԿԱԿԱՆ ԿԻՍԱԿՈՊՏԱԲՈՒՐԴ ՑԵՂԵՐԻ ՈՉԽԱՐՆԵՐԻ ՏՐԱՍՄԱԽԱՉՈՒՄԻՑ ՍՏԱՑՎԱԾ ԽԱՌՆԱԾԻՆՆԵՐԻ ԱՐՅԱՆ ՈՐՈՇ ՑՈՒՑԱՆԻՇՆԵՐԸ

Տ.Ա. ՍԱՐԳՍՅԱՆ

Հայաստանի ազգային ագրարային համալսարան
tatev.sargsyan@yahoo.com

Արագածոտնի մարզի Արագածավանի «Ագրոհոլդինգ» ՍՊԸ-ի ոչխարաբուծական տնտեսությունում ուսումնասիրվել է հայկական կիսակոպտաբուրդ և ռոմանովյան ցեղերի ոչխարների տրամախաչումից ստացված 8, 10 ամսական և 1,5 տարեկան խառնածինների արյան որոշ ցուցանիշներ (իմունոգլոբուլին IgG, էրիթրոցիտներ, լեյկոցիտներ, հեմոգլոբին): Ստացված արդյունքները վկայում են խառնածին կենդանիների բարձր հարմարվողականության, կայուն իմունային համակարգի և նյութափոխանակության առավել ինտենսիվ գործընթացների մասին:

Տրամախաչում – մաքրացել – խառնածին – հեմատոլոգիական ցուցանիշներ

В овцеводческом хозяйстве ООО “Агрохолдинг” с. Арагацаван области Арагацотн были изучены некоторые гематологические показатели (иммуноглобулин IgG, эритроциты, лейкоциты, гемоглобин) 8-, 10-месячных и 1,5-годичных помесей, полученных скрещиванием романовских и армянских полугрубошерстных овец. Полученные данные свидетельствуют о высокой приспособляемости, стабильной иммунной системе и о более интенсивных процессах обмена веществ помесных животных.

Скрещивание – чистопородный – помесь – гематологические показатели

In sheep-breeding farm of “Agroholding” LLC in the village of Aragatsavan, Aragatsotn marz, some hematologic indicators (IgG immunoglobulin, an erythrocyte (red blood cell), a leukocyte (white blood cell), hemoglobin) of 8, 10 monthly and 1.5 year-old hybrids obtained by crossing of the Romanovs and Armenian semi-coarse-haired sheep have been studied. The obtained data testify to high fitness, stable immune system and more intensive processes of a metabolism of local animals.

Crossings – thoroughbred – hybrid – hematologic indicators

Ժամանակակից պայմաններում բնակչությունն ունի ոչխարի մսի օգտագործման մեծ պահանջարկ, որը մարդու սննդի հաշվեկշռում առանձնանում է իր բարձր սննդարարությամբ, լիարժեքությամբ և հիմնականում անփոխարինելիությամբ [1]: Այն մեծ քանակով նաև արտահանվում է: Դրանով է պայմանավորված լավագույն համային հատկանիշներով օժտված ոչխարամսի արտադրողականության բարձրացման անհրաժեշտությունը: Ոչխարների մսային արտադրողականությունը որոշվում է շատ գործոններով, որոնցում իր ուրույն դերն ունի կենդանիների բարձր կենսունակության ապահովումը: Կենդանիների կենսունակությունը կախված է միջավայրի, կերակրման ու խնամքի պայմաններից, ինչպես նաև ծնողներից ստացած ժառանգական հիմքից ու նյութափոխանակության գործընթացների ակտիվությունից: Այդ տեսանկյունից օրգանիզմի կենսունակության ապահովման գործում իր առանձնահատուկ դերն ունի կենդանու արյունը, որը մասնակցում է շնչառական և նյութափոխանակության գործընթացներին և բազում այլ ֆունկցիաների հետ մեկտեղ ունի պաշտպանական նշանակություն: Այն պաշտպանում է օրգանիզմը մանրէներից, վիրուսներից և դրանց թույներից, ինչպես նաև օրգանիզմի համար օտարածին նյութերից: Այս գործառույթն իրականացվում է պլազմայի մանրէասպան հատկությամբ, լեյկոցիտների ֆագոցիտային ակտիվությամբ, ինչպես նաև իմուն-

նակումպետենտ բջիջների՝ լիմֆոցիտների շնորհիվ, որոնք իրականացնում են բջջային մենահատուկ իմունիտետը [2]: Օրգանիզմի ներքին միջավայրի, նրա պաշտպանական համակարգի ակտիվության և նյութափոխանակության գործընթացների գնահատման համար կարող են հիմք ծառայել արյունաբանական ցուցանիշները: Դրանով է պայմանավորված մեր հետազոտությունների հետաքրքրությունը ռոմանովյան և հայկական կիսակոպ-տաբուրդ (ՀԿԿԲ) ցեղերի ոչխարների տրամախաչումից ստացված խառնածինների արյունաբանական ցուցանիշների դիսամիկայի փոփոխության նկատմամբ:

Ուստի սույն աշխատանքի նպատակն է եղել ուսումնասիրել տրամախաչման արդյունքում ստացված խառնածին կենդանիների արյան որոշ ցուցանիշներ, որոնցով պայմանավորված են վեջիսներիս հարմարվածությունը, կենսունակությունը և նյութափոխանակությունը:

Նյութ և մեթոդ: Հետազոտությունները կատարվել են Արագածոտնի մարզի «Ագրոիդ-դինգ» ՍՊԸ ոչխարաբուծական տնտեսությունում, որտեղ առաջին անգամ Հայաստանի Հանրապետությունում 2011թ-ից արհեստական սերմավորման եղանակով իրականացվում է ռոմանովյան և ՀԿԿԲ ոչխարների տրամախաչում: Հետազոտությունները կատարվել են «Վլադիմիր Ավագյանի անվան բժշկական կենտրոն» ՍՊԸ և «A.B.MED» լաբորատորիաներում: Ուսումնասիրել ենք 8, 10 ամսական և 1,5 տարեկան կենդանիների արյան որոշ ցուցանիշներ և համեմատել նույն տարիքի տեղական մաքրացել կենդանիների արյան ցուցանիշների հետ: Յուրաքանչյուր խմբից վերցվել է 5-ական նմուշ: Ընդհանուր առմամբ ուսումնասիրվել է 30 գլուխ մաքրացել և խառնածին կենդանիների արյան նմուշներ: Հետազոտվել ենք հետևյալ ցուցանիշները՝ իմունոգլոբուլին IgG-ի պարունակությունը, Էրիթրոցիտների քանակը, հեմոգլոբինի պարունակությունը և լեյկոցիտների քանակը: Էրիթրոցիտների, հեմոգլոբինի և լեյկոցիտների որոշումն կատարվել է ֆոտոմետրիկ, իսկ իմունոգլոբուլին IgG-ին՝ իմունոտուրբիդիմետրիկ եղանակներով:

Արդյունքներ և քննարկում: Արյունաբանական ցուցանիշների հետազոտությունների տվյալները ներկայացված են աղ. 1-ում: Կենդանիներն ուսումնասիրման որջ ժամանակահատվածում գտնվել են կերակրման, խնամքի ու պահվածքի միևնույն պայմաններում: Արյունաբանական ցուցանիշները (Էրիթրոցիտներ, լեյկոցիտներ, հեմոգլոբին, իմունոգլոբուլին) որոշվել են միևնույն կերակրումը:

Աղյուսակ 1. Արյան որոշ ցուցանիշների հետազոտման արդյունքները ըստ կենդանիների տարիքի

Հասակային խումբ	Մաքրացել (ՀԿԿԲ)		Խառնածին (Ռոմ. X ՀԿԿԲ)	
	M±m	σ	M±m	σ
<i>Իմունոգլոբուլին IgG (գ/լ)</i>				
8 ամսական	7,63±0.24	0.55	8,01±0.06	0.14
10 ամսական	8,05±0.39	0.87	8,88±0.32	0.72
1,5 տարեկան	8,83±0.19	0.43	9,69±0.38	0.86
<i>Էրիթրոցիտների քանակը 1 մմ³ արյան մեջ</i>				
8 ամսական	7,6±0.34	0.78	8,7±0.29	0.65
10 ամսական	8,2±0.19	0.43	9,4±0.39	0.87
1,5 տարեկան	9,8±0.35	0.79	10,6±0.34	0.77
<i>Հեմոգլոբին, %</i>				
8 ամսական	98±3.48	7.77	103±3.68	8.21
10 ամսական	106±2.74	6.12	111±2.12	4.74
1,5 տարեկան	119±1.52	3.39	126±1.30	2.91
<i>Լեյկոցիտների քանակը 1 մմ³ արյան մեջ</i>				
8 ամսական	7,3±0.22	0.50	8,1±0.37	0.84
10 ամսական	7,9±0.28	0.64	8,8±0.26	0.58
1,5 տարեկան	8,01±0.14	0.33	9,0±0.20	0.45

Կենդանիների կենսունակությունը, ֆիզիոլոգիական վիճակը և մթերատվությունը մեծապես կապված են իմունոգլոբուլինների քանակի և ակտիվության հետ: Իմունոգլոբուլինները հանդիսանում են օրգանիզմի հիմնական պաշտպանիչ սպիտակուցները և կենդանիների հումորալ իմունիտետի գլխավոր ու գործարկվող մոլեկուլները: Շիճուկային իմունոգլոբուլին IgG-ն կազմում է բոլոր սպիտակուցների 75-80%-ը և արյան բոլոր սպիտակուցների 10-20%-ը [3]: Նրա գլխավոր և հիմնական գործառույթը ֆագոցիտոզի խթանումն է:

Հետազոտությունները ցույց են տվել, որ մաքրացել և խառնածին կենդանիների մոտ իմունոգլոբուլին IgG-ի մակարդակը տարիքի հետ աճում է, մաքրացելի մոտ 8-1,5 տարեկանում կազմել է 13,6%, իսկ խառնածինի մոտ՝ 17,3%: Ինչպես երևում է աղ.1-ից իմունոգլոբուլին IgG-ի աճ է նկատվում խառնածին կենդանիների տարիքային բոլոր խմբերում ի տարբերություն մաքրացել կենդանիների համապատասխան հասակների:

Այսպես, 8 ամսական մաքրացել մատղաշի մոտ այն կազմել է 7,63 գ/լ, նույն հասակի խառնածինի մոտ 8,01 գ/լ, 10 ամսական մաքրացելի մոտ 8,05 նույն հասակի խառնածինի մոտ 8,88 գ/լ, իսկ 1,5 տարեկանում՝ 8,83-ից աճել է մինչև 9,69 գ/լ: Աճը ըստ տարիքի համապատասխանաբար կազմել է 4,7%, 9,3%, 8,9%:

Արյան ձևավոր տարրերի պարունակությունը բնութագրում է արյունաստեղծ օրգանների և պաշտպանական մեխանիզմների ֆունկցիաները: Հայտնի է, որ Էրիթրոցիտների կարևոր ֆունկցիաներից մեկը՝ թթվածնի տեղափոխումն է թոքերից հյուսվածքներ և օրգաններ: Ուսումնասիրությունները ցույց են տվել, որ նույն տարիքային խմբում խառնածին կենդանիների մոտ Էրիթրոցիտների քանակը ավելի բարձր է, քան հայկական կիսակոպտաբուրդ՝ մաքրացել կենդանիների մոտ: Աճը 8 ամսական խառնածինի մոտ $8,7 \times 10^{12}/լ$ է, մաքրացելի $7,6 \times 10^{12}/լ$ -ի համեմատ: 10 ամսական խառնածինների և մաքրացելի մոտ համապատասխանաբար $10,6 \times 10^{12}/լ$ և $9,8 \times 10^{12}/լ$: Այսպիսով՝ ըստ տարիքային խմբերի Էրիթրոցիտների քանակի աճը մաքրացել կենդանիների համեմատ կազմել է՝ 8 ամսականների մոտ 12,6%, 10 ամսականների մոտ 12,8%, իսկ 1,5 տարեկանների մոտ՝ 7,5%: Ինչպես իմունոգլոբուլինի, այնպես էլ Էրիթրոցիտների քանակը երկու խմբերում էլ տարիքին զուգընթաց աճել է՝ խառնածինների մոտ $8,7 \times 10^{12}/լ$ -ից հասնելով $10,6 \times 10^{12}/լ$, իսկ մաքրացելի մոտ $7,6 \times 10^{12}/լ$ -ից $9,8 \times 10^{12}/լ$:

Հետազոտությունների արդյունքում հեմոգլոբինի առավելագույն մակարդակը նկատվել է խառնածին մատղաշների և շիշակների մոտ: Այսպես, 8 ամսական խառնածին մատղաշի մոտ 103 գ/լ, 10 ամսականում 111 գ/լ և 1,5 տարեկանում 126 գ/լ մաքրացելի հետևյալ ցուցանիշների նկատմամբ՝ 8 ամսական 98 գ/լ, 10 ամսական 106 գ/լ, 1,5 տարեկան շիշակների մոտ 119 գ/լ: Կարելի է ենթադրել, որ խառնածինների մոտ Էրիթրոցիտների և հեմոգլոբինի առավել մեծ պարունակությունը վկայում է տվյալ կենդանիների բարձր թթվածնային տարողության, նրանում օքսիդացման և հետևաբար նյութափոխանակության առավել ինտենսիվ պրոցեսների մասին: Նշենք նաև, որ Էրիթրոցիտների առավել բարձր քանակը և հեմոգլոբինով նրանց առավելագույն հագեցվածությունը մատղաշի պաշտպանական պոտենցիալի առավել բարձր մակարդակի ցուցանիշներն են [4]: Օրգանիզմում ոչ պակաս կարևոր նշանակություն ունեն լեյկոցիտները, նրանք մասնակցում են օրգանիզմի պաշտպանական (ֆագոցիտոզ, իմունիտետ) և վերականգնողական գործընթացներին (հակամարմինների արտադրում, թույների բայթայում և հեռացում): Երկու խմբերի մատղաշների մոտ էլ լեյկոցիտների քանակը եղել է ֆիզիոլոգիական նորմերի սահմաններում: 8 ամսական մաքրացել կենդանիներ մոտ $7,3 \times 10^9/լ$, խառնածինների մոտ $8,1 \times 10^9/լ$, 10 ամսական մաքրացելի մոտ $7,9 \times 10^9/լ$, խառնածինների մոտ $8,8 \times 10^9/լ$ և 1,5 տարեկան մաքրացելիները $8,01 \times 10^9/լ$, իսկ խառնածիններինը $9,0 \times 10^9/լ$: Տարիքի հետ երկու խմբերի կենդանիների մոտ էլ տեղի է ունեցել արյան սպիտակ գնդիկների քանակի ավելացում, սակայն առավել բարձր մակարդակ է զրանցվել խառնածին կենդանիների բոլոր տարիքային խմբերում: Դա, ըստ երևույթին, պայմանավորված է խառնածինների լավ հարմարվողականությամբ և հիվանդությունների նկատմամբ ունեցած բարձր դիմադրողականությամբ:

Հարկ է նշել, որ մեր կողմից ուսումնասիրված կենդանիների արյունաբանական ցուցանիշները գտնվում են ֆիզիոլոգիական նորմի սահմաններում: Ցուցանիշների առավել բարձր մակարդակ դիտվում է խառնածինների բոլոր տարիքային խմբերում, որոնք ստացվել են ռոմանովյան և ՀԿԿԲ ցեղերի ոչխարների տրամախաչման արդյունքում:

Ստացված արդյունքները վկայում են խառնածին կենդանիների բարձր հարմարվողականության, կայուն իմունային համակարգի և նյութափոխանակության առավել ինտենսիվ պրոցեսների մասին:

Այսպիսով՝ հետազոտությունների արդյունքները վստահեցնում են, որ նոր ստացված սերունդը արյան կազմով ոչ միայն չի զիջում մաքրացելին, այլ ընդհակառակը՝ ՀԿԿԲ ցեղի նկատմամբ ունի կենսունակության առավելություն:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. Մարմարյան Յու. Գ. Անաստարծության հիմունքների. Ասորիկ, Երևան, էջ 433, 2001:
2. Տերտրյան Ե.Ե., Համբարձումյան Գ. Ռ. Մինասյան Ս. Ս., Մխիթարյան Ռ.Ս. Ընտանի կենդանիների ֆիզիոլոգիա, հր.ՀԱՄՀ Եր., էջ 577,
3. 2014.<http://www.aptekaonline.ru/forum2/index.php?topic=5520.0>
4. Продуктивно-биологические показатели молодняка овец северокавказской породы разных сроков отъема "Овцы, козы, шерстяное дело,, М., 4, с. 27-29, 2012.

Ստացվել է 06.10.2014



Biolog. Journal of Armenia, 2 (67), 2015

ZEOLITE NANOPARTICLES – NANOCONTAINERS OF PORPHYRINS

A.G. GYULKHANDANYAN

*Institute of Biochemistry NAS of RA
anna.g_yan@yahoo.fr*

The sorption of five cationic porphyrins and metalloporphyrins as well as well-known anionic photosensitizers (chlorin e6 and Al-phthalocyanine) was investigated with zeolite nanoparticles. It is shown that the percentage of adsorption of porphyrins with zeolite nanoparticles is more than 90 and that the predominant mechanism of binding is electrostatic binding of cationic porphyrins with the negatively charged zeolite nanoparticles.

Zeolite nanoparticles – cationic porphyrins – electrostatic binding

Ցեոլիտի նանոմասնիկների հետ ուսումնասիրվել է հինգ կատիոնային պորֆիրինների և մետաղապորֆիրինների, ինչպես նաև հայտնի անիոնային ֆոտոսենսիբիլիզատորների (քլորին e6 և Al-ֆտալոցիանին) սորբցիան: Ցույց է տրվել, որ ադսորբցիայի տոկոսը ցեոլիտի նանոմասնիկների հետ բոլոր պորֆիրինների համար ավելի քան 90 է և որ կապման գերադասող մեխանիզմն է կատիոնային պորֆիրինների էլեկտրոստատիկ կապը բացասական լիցքավորված ցեոլիտի նանոմասնիկների հետ:

Ցեոլիտի նանոմասնիկներ – կատիոնային պորֆիրիններ – էլեկտրոստատիկ կապ

С наночастицами цеолита исследована сорбция пяти катионных порфиринов и металлопорфиринов, а также известных анионных фотосенсибилизаторов (хлорин е6 и Al-фталочинин). Показано, что процент адсорбции для всех порфиринов с наночастицами цеолита более 90 и что преобладающим механизмом связывания является электростатическое связывание катионных порфиринов с отрицательно заряженными наночастицами цеолита.

Наночастицы цеолита – катионные порфирины – электростатическое связывание

Currently, photodynamic inactivation of microorganisms by photosensitizers is one of the most promising areas for the destruction of the antibiotic resistant microorganisms [1-3]. Photosensitizers (PS), mainly porphyrins, under action of light promote generation of reactive oxygen species [4], which effectively inhibit growth and kill microorganisms [1-3]. In recent years in order to improve efficiency of porphyrins against microorganisms actively used nanocontainers [5]. Among the many types of nanoparticles-nanocontainers used to enhance the effectiveness and targeted delivery of photosensitizers, nanoparticles of zeolites occupy a special place due to the high biological activity, and unique sorption possibilities of microorganisms [6], as well of ligands - porphyrins [7]. The above presented background of use of zeolites and their advantages are strong argument of the need for detailed and careful study of porphyrin complexes with nanoparticles of zeolite. These tasks of interaction of various cationic porphyrins and zeolite nanoparticles comprise the aim of the present work.

Materials and methods. Study of processes sorption and quantitative description of the binding of porphyrin molecules with the zeolite nanoparticles was carried out in vitro in the spectral quartz cuvettes on the spectrophotometer "Shimadzu" UV-VIS 2100 (Japan) in the range of 200-800 nm.

Porphyryns and metalloporphyryns. Photosensitizers – water-soluble porphyryns with various side-chain substituents and the central metal atom were synthesized at the Department of Organic Chemistry, Yerevan State Medical University [8, 9] and have been provided for researches. For investigation of sorption on/in nanoparticles of zeolite the following five cationic porphyryns and metalloporphyryns we used: i) meso-tetra (4-N-oxyethyl pyridyl) porphyrin (TOEt4PyP), ii) Zn-TOEt4PyP, iii) meso-tetra (3-N-oxyethyl pyridyl) porphyrin (TOEt3PyP), iv) Zn-meso-tetra (4-N-butyl pyridyl) porphyrin (Zn-TBut4PyP) and v) Ag-TBut4PyP, as well as known anionic photosensitizers: chlorin e6 and Al-phthalocyanine.

Zeolite nanoparticles. Nanoparticles of natural zeolite mineral – clinoptilolite of nanometric sizes were obtained by mechanical crushing and subsequent sedimentation in aqueous solution [10]. The size of nanoparticles by laser analyzer type IG-1000 (Shimadzu, Japan), range 0.5-200 nm, or electron microscopy was monitored.

Statistical analysis. The statistical parameters (average values, standard deviation) used in the experiments were calculated using the program Excel.

Results and Discussion. To the solution of porphyrin with volume 2 ml and the final concentration of 10^{-5} M successively 0.2, 0.3, 0.5, 0.6, 0.7 and 0.8 ml of zeolite nanoparticles was added (initial concentration of 0.66 mg/ml). By successively increasing of concentrations of the added zeolite nanoparticles (from 0.2 ml = 0.06 mg/ml to 0.6 ml = 0.15 mg/ml) into a solution of metalloporphyrin Zn-TBut4PyP was shown directly proportional dependence of the increase of its sorption ability (first 4 points on fig.1), whereas adding nanoparticles 0.7 ml = 0.17 mg/ml and 0.8 ml = 0.19 mg/ml saturation of adsorption ability of zeolite occurs (fig. 1).

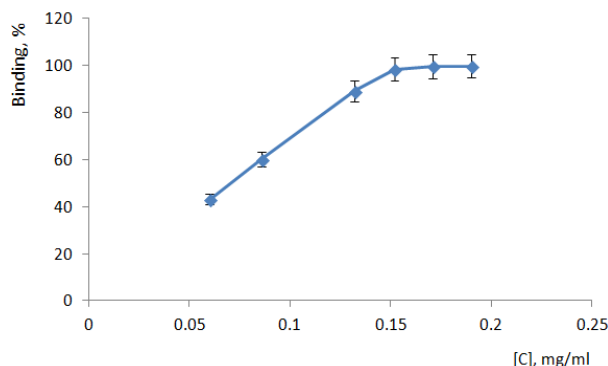


Fig. 1. Percent of binding of metalloporphyrin Zn-TBut4PyP at various concentrations of zeolite nanoparticles in solution

Thus the addition to a solution of porphyrin of zeolite nanoparticles can be carried out to a concentration of 0.15 mg/mL (addition of 0.6 ml zeolite nanoparticles from the stock solution with the zeolite concentration 0.66 mg/ml). Based on the obtained results for all other cationic porphyryns to 2 ml solution of a porphyrin 0.6 mL zeolite was added so that the final concentration of the porphyrin is in solution 10^{-5} M and then counted the sorption after centrifugation of this solution (15 thousand rpm, 15 min) and determining the residual porphyrin (Soret absorption band at 420-440 nm). The results of the sorption by zeolite nanoparticles of 5 different cationic porphyryns as well as the anionic porphyrin chlorin e6 and neutral photosensitizer Al-phthalocyanine are shown in tab. 1.

Table 1. % sorption of porphyrins (10^{-5} M) by adding to a solution of 0.6 ml of zeolite nanoparticles (0.15 mg/ml)

Porphyrins	TOEt4PyP	TOEt3PyP	Zn-TOEt4PyP	Zn-TBut4PyP	Ag-TBut4PyP	chlorine	Al-phthalocyanine
% sorption	97.1 ±3.6%	98.5 ±3.9%	98.3 ±3.9%	98.7 ±4.0%	95.0 ±3.4%	24.4 ±1.1%	0%

Analysis of the dynamics of change in the absorption spectra for porphyrins and metalloporphyrins (10^{-5} M) by adding of nanoparticles leads to the conclusions: i) that the percentage of adsorption on nanoparticles is for all cationic porphyrins more than 90 %, ii) that the predominant mechanism of binding is the electrostatic binding of cationic porphyrins and metalloporphyrins (charge +4) on the negatively charged surface or internal cavities of the zeolite nanoparticles.

Acknowledgements. The author thanks R. K. Ghazaryan and H. H. Sargsyan for kindly providing porphyrins and nanoparticles of zeolite.

REFERENCES

1. Stojiljkovic I., Evavold B.D., Kumar V. Antimicrobial properties of porphyrins. *Exp. Opin. Invest. Drugs*, 10, 2, 309-320, 2001.
2. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy. *J. Antimicrob. Chemotherapy*, 42, 13-28, 1998.
3. Hamblin M.R., O'Donnell D.A., Mufthy N., Rajagopalan K., Michaud N., Sherwood M.E., Hasan T. Polycationic photosensitizer conjugates: effect chain length and Gram classification on the photodynamic inactivation of bacteria. *J. Antimicrob. Chemotherapy*, 49, 941-951, 2002.
4. Bonnett R. Photosensitizers of the porphyrins and phthalocyanine series for photodynamic therapy. *Chem. Soc. Rev.*, 24, 19-33, 1995.
5. Perni S., Prokopovich P., Pratten J., Parkin I.P., Wilson M. Nanoparticles: their potential use in antibacterial photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 10, 5, 712-720, 2011.
6. Kubota M., Nakabayashi T., Matsumoto Y., Shiomi T., Yamada Y., Ino K., Yamanokuchi H., Matsui M., Tsunoda T., Mizukami F., Sakaguchi K. Selective adsorption of bacterial cells onto zeolites. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, 64, 1, 88-97, 2008.
7. Faraon V., Ion R.M. Ship-in-bottle porphyrin – zeolite nanomaterials. *Optoelectronics and Advanced Materials-Rapid Communications*, 4, 8, 1135-1140, 2010.
8. Madakyan V.N., Kazaryan R.K., Khachatryan M.A., Stepanyan A.S., Kurtikyan T.S., Ordyan M.B. New derivatives of meso-tetra (4-pyridyl) porphyrin and their some transformations. *Khimiya heterociklicheskih soedineniy*, 2, 212-216, 1986.
9. Tovmasyan A.G., Ghazaryan R.K., Sahakyan L., Gasparyan G., Babayan N., Gyulkhandanyan G. Synthesis and anticancer activity of new water-soluble cationic metalloporphyrins. *European Conferences on Biomedical Optics 2007*, 17-21, June, 2007, Munich, Germany, Technical Abstract Summaries, pp. 71-72, 2007.
10. Sargsyan H.H., Gevorgyan R.G. and Aleksanyan G.M. International conference "Zeolites and zeolite similar structural materials", Como (Italy), September 13-16, 2004, Abstracts, p. 115, 2004.

Received on 21.01.2015



Биол. журн. Армении, 2 (67), 2015

К ГЕЛЬМИНТОФАУНЕ РЫБ РЕКИ МЕЦАМОР

Р.Л. ОГАНЕСЯН, М.Я. РУХКЯН

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

Приводятся данные исследований по выявлению гельминтофауны рыб р. Мецамор. Обследовано 108 экз. 9-ти видов рыб. Инвазированность рыб составила 41,7 % (45 экз.). Зарегистрировано 6 видов гельминтов. Они обнаружены в полости тела, кишечнике, хрусталиках глаз и на жабрах рыб. Определены экстенсивность инвазии (ЭИ) и интенсивность инвазии (ИИ) рыб гельминтами.

Гельминтофауна рыб – р. Мецамор – экстенсивность и интенсивность инвазии

Տրվում են Մեծամոր գետի ձկների հելմինթոֆաունայի բացահայտման հետազոտությունների տվյալները: Հետազոտվել է 9 տեսակ ձկների 108 նմուշ: Վարակված էր ձկների 41,7 %-ը: Գրանցվել է հելմինթների 6 տեսակ: Դրանք հայտնաբերվել են ձկների մարմնի խոռոչում, աղիներում, աչքի ոսպնյակում և խոռիկներում: Որոշվել են ձկների՝ հելմինթներով վարակվածության էքստենսիվությունը և ինտենսիվությունը:

Ձկների հելմինթոֆաունա – Մեծամոր գետ – վարակվածության էքստենսիվություն և ինտենսիվություն

Data on helminth fauna of fishes from the Metsamor river are presented. 108 specimens of 9 fish species have been investigated. 41,7 % of fishes (45 specimens) were infected. 6 species of helminths have been recorded. They were found out in the body cavity, intestine, crystalline lenses and on the gills of fishes. Extensiveness and intensity of invasion by helminths have been calculated.

Fish helminth fauna – river Metsamor – extensiveness and intensity of invasion

Река Мецамор (Севджур) является крупным левобережным притоком реки Аракс, имеет важное хозяйственное значение для Армении. Она берет начало из оз. Акналич и близлежащих болот, медленно течет по полупустынной равнине, питаясь грунтовыми водами, превращаясь вскоре в широкую, до 100 м шириной полноводную реку, извивающуюся в плоских берегах. Половодье р. Мецамор происходит благодаря бурным водам р. Касах, впадающей в нее.

Гельминтофауна рыб р. Мецамор не изучена. Однако в 1980-х гг. изучалась паразитофауна рыб некоторых естественных и искусственных водоемов Араратской равнины, в т. ч. водоемов Армавирского марза [2-7]. Во всех водоемах у рыб были широко распространены метацеркарии трематод рода *Diplostomum* [2, 3, 6], а также были зарегистрированы цестоды *Bothriocephalus gowkongensis* [4] и *Ligula*

[4, 6, 7]. Впервые в гельминтофауне рыб водоемов Армении у сазана из оз. Акналич была обнаружена трематода *Clinostomum complanatum*, а у куринской уклейки и плотвы из Октемберянских озер – трематода *Posthodiplostomum cuticola* [2]. Фауна дактилогирусов водоемов Армении была представлена следующими видами: *Dactylogyrus sphyrna* (у густеры), *D. cornu* и *D. jamansajensis* (у плотвы), *D. Extensus* (у карпа) [5]. Дан сравнительный фаунистический анализ паразитов рыб естественных водоемов Араратской равнины [4]. Выявлен видовой состав гельминтов рыб карповых хозяйств Араратской равнины, дана гельминтологическая оценка этих хозяйств, изучена сезонная динамика инвазированности рыб гельминтами и установлены основные гельминтозы рыб этих хозяйств [6]. Из 12-ти обнаруженных видов гельминтов рыб 4 отмечены впервые в гельминтофауне Армении: *Eudiplozoon nipponicum*, *Diplostomum rutili*, *D. mergi*, *Caryophyllaeus fimbriceps*, в т. ч. 1 вид (*Eudiplozoon nipponicum*) – в фауне Закавказья [7].

Исследование видового состава гельминтов рыб р. Мецамор представляет научный и практический интерес, тем более в современных условиях повышенного негативного антропогенного пресса.

В настоящее время в р. Мецамор обитают более 30-ти видов рыб: армянская плотва, куринская уклейка, серебряный карась, армянская быстрянка, куринский усач, кавказский голавль, терский подуст, севанская храмуля, радужная форель, закавказская густера, бычок-песочник, ангорский голец, амурский чебачок, черноморка и др. [10].

Целью работы являлось выявление гельминтофауны рыб р. Мецамор.

Материал и методика. Исследования проводили в 2013г. Материалом исследований послужили сборы гельминтов рыб из р. Мецамор. Методом полных паразитологических вскрытий по общепринятой методике [1] всего было обследовано 108 экз. 9-ти видов рыб из 2 сем. Из сем. *Cyprinidae* обследовано 104 экз. рыб, в т.ч.: серебряный карась (*Carassius auratus*) – 24 экз., храмуля (*Capoeta capoeta*) – 18 экз., плотва (*Rutilus rutilus*) – 13 экз., усач (*Barbus lacerta*) – 12 экз., уклейка (*Alburnus filippii*) – 10 экз., быстрянка (*Alburnoides bipunctatus*) – 10 экз., голавль (*Leuciscus cephalus*) – 9 экз., подуст (*Chondrostoma cyri*) – 8 экз.; из сем. *Salmonidae*: форель радужная (*Parasalmo mykiss*) – 4 экз.

После изъятия из органов рыб гельминтов промывали в воде и фиксировали в соответствующих растворах, в зависимости от их систематического положения. Для определения видовой принадлежности гельминтов подвергали камеральной обработке по общепринятой методике [1]. Определение видов гельминтов проводили по Определителю паразитов пресноводных рыб фауны СССР [8, 9], видов метацеркариев диплостом – по Шигину [11], предварительно измерив под микроскопом с окуляр-микрометром длину и ширину личинки, ротовой и брюшной присосок, органа Брандеса и др. Определена степень зараженности рыб отдельными видами гельминтов, выражающаяся экстенсивностью инвазии (ЭИ) и интенсивностью инвазии (ИИ).

Результаты и обсуждение. Из 108 обследованных рыб р. Мецамор гельминтами было инвазировано 45 экз. (41, 7 %).

У рыб обнаружено 6 видов гельминтов: 1 вид моногеней – *Dactylogyrus* sp., 3 вида трематод – *Diplostomum spathaceum*, *D. paraspachaceum*, *D. mergi*, 2 вида цес-тод – *Ligula intestinalis*, *Bothriocephalus opsariichthydis*. Они локализованы на жабрах, в хрусталиках глаз, полости тела и кишечнике рыб. На жабрах карасей обнаружены моногеней *Dactylogyrus* sp. ЭИ = 9 %, ИИ – 1 экз.

В хрусталиках глаз всех видов карповых рыб обнаружены метацеркарии трематод рода *Diplostomum*. ЭИ карасей составляла 38 %, ИИ – 2 экз., у храмуль ЭИ равнялась 35 %, ИИ – 2 экз.; соответственно у усача – 25 % и 2 экз., у плотвы – 15 % и 2 экз., у быстрянки и уклейки – 30 % и 2 экз., у голавля и подуста – 1 %, 1 экз.

В полости тела карасей и храмуль обнаружены плероцеркоиды ремнеца *Ligula intestinalis*. ЭИ карасей лигулами составляла 25 %, ИИ – 2 экз., ЭИ храмуль – 11 %, ИИ – 1 экз. В кишечнике карасей впервые для Армении найдена цестода *Bothriocephalus opsariichthydis*, ЭИ=13 %, ИИ – 1-2 экз.

В фауне гельминтов рыб р. Мецамор преобладают биогельминты – 5 видов. Из них наиболее распространены метацеркарии диплостом из хрусталиков глаз и плероцеркоиды лигул, паразитирующие в полости тела рыб. Из геогельминтов обнаружен 1 вид (*Dactylogyrus* sp.). Из 6-ти обнаруженных видов гельминтов рыб 4 являются аллогенными (*Diplostomum spathaceum*, *D. paraspachaceum*, *D. mergi*, *Ligula intestinalis*), 2 – автогенными (*Bothriocephalus opsariichthydis* и *Dactylogyrus* sp.); 4 вида относятся к генералистам (кроме *Bothriocephalus opsariichthydis* и *Dactylogyrus* sp.), 5 – являются эндопаразитами, 1 вид (*Dactylogyrus* sp.) – эктопаразит.

При сравнении наших данных по фауне гельминтов рыб р. Мецамор с результатами исследований гельминтофауны рыб Октемберянских озер и оз. Акналич (из которого вытекает река), проведенных в 1980-е гг. [2, 5], выявлена тенденция некоторого обеднения фауны гельминтов как в качественном, так и в количественном отношении. Так, 2 вида трематод – *Clinostomum complanatum* и *Postodiplostomum cuticola*, впервые для Армении отмеченные в 80-е гг. [2], нами не были обнаружены. Фауна дактилогирисов водоемов Армении, как отмечалось выше, в те годы также была разнообразнее [5]. Что касается степени зараженности рыб гельминтами, она также снизилась. Так, в 1980-е гг. ЭИ метацеркариями диплостом у быстрянки из Октемберянских озер составляла 100 %, ИИ – 2-4 экз., у храмули ЭИ – 40 %, ИИ – 5-7 экз. [2], а по нашим данным, соответственно у быстрянки – 30 % и 2 экз., у храмули – 35 % и 2 экз.

Таким образом, результаты исследований показывают, что гельминтофауна рыб р. Мецамор не отличается богатым разнообразием.

ЛИТЕРАТУРА

1. Быховская-Павловская И.Е. Паразиты рыб. Руководство по изучению. Л., Наука, 121, с., 1985.
2. Вартанян Л.К. Паразитофауна рыб озера Севан и некоторых других водоемов и водотоков Армении. Автореф. канд. дисс., Ереван, 22 с., 1993.
3. Григорян Дж.А. Вартанян Л.К. Паразитические личинки трематод рыб водоемов Армении. Ученые записки ЕГУ, 1, 107-111, 1980.
4. Григорян Дж. А., Погосян С.Б. Сравнительный фаунистический анализ паразитов рыб естественных водоемов Арагатской равнины. Биолог. журн. Армении, 36, 10, 884-889, 1983.
5. Григорян Дж. А. К изучению фауны дактилогирисов водоемов Армении. Биолог. журн. Армении, 38, 6, 541-545, 1985.
6. Оганесян Р.Л. Гельминтологическая оценка прудовых карповых хозяйств Арагатской равнины, „Паразитология“, С.- П., 38, 1, 88-93, 2004.
7. Оганесян Р.Л. Новые виды в гельминтофауне рыб Армении. Биолог. журн. Армении, 61, 3, с. 32-37, 2009.
8. Определитель паразитов пресноводных рыб фауны СССР, 2, Паразитические многоклеточные (Первая часть). Л., Наука, 425 с., 1985.
9. Определитель паразитов пресноводных рыб фауны СССР, 3, Паразитические многоклеточные (Вторая часть). Л., Наука, 583с., 1987.
10. Пипоян С.Х. Ихтиофауна Армении и этапы ее формирования. Автореф. докт. дисс., Ереван, 42 с., 2010.
11. Шигин А.А. Трематоды фауны СССР. Род *Diplostomum*. Метацеркарии. М., Наука, 256 с., 1986.

Поступила 03.02.2014



Biolog. Journal of Armenia, 2 (67), 2015

CREATION OF MIXED LIPID BILAYER: A FORCE FIELD DEVELOPMENT

A.H. POGHOSYAN, N. M. AYVAZYAN

*The International Scientific – Educational Center of NAS RA,
L.Orbeli Institute of Physiology of NAS RA
poghosyan@gmail.com*

A mixed bilayer with 64 various lipid molecules were built and tested by the GROMACS software package modules. The force fields of mentioned 64 lipid molecules were generated using PRODRG and ATB servers and partially changed taking into account the features of lipid molecules. Simultaneously, we have created a mixed bilayer using CHARMM-GUI online generator server, which is aimed to create lipid bilayers with different lipid molecules. Note that the latter provide force fields for CHARMM input. The resulting mixed bilayer was minimized and equilibrated for long run simulation.

Computer simulations – force field development

GROMACS ծրագրային փաթեթի մոդուլներով կառուցվել և թեստավորվել է 64 տարբեր լիպիդային մոլեկուլներով խառը երկշերտ: Վերը նշված 64 լիպիդային մոլեկուլների ուժային դաշտը ստացվել են PRODRG և ATB սերվերներով և մասամբ փոփոխվել են հաշվի առնելով լիպիդային մոլեկուլների առանձնահատկությունները: Միաժամանակ, կառուցվել է խառը երկշերտ, օգտագործելով CHARMM-GUI առցանց գեներատոր սերվերը, որը նախատեսված է տարբեր լիպիդային մոլեկուլներով լիպիդային երկշերտերի կառուցման համար: Նշենք, որ վերջինս ապահովում է CHARMM ուժային դաշտերը: Արդյունքում խառը երկշերտը մինիմիզացվել է և հավասարակշռվել երկարաժամկետ մոդելավորման ընթացքում:

Համակարգչային ուսումնասիրություն – ուժային դաշտերի մշակում

Смешанный бислой 64 разными липидными молекулами были построены и протестированы с помощью модулей программного обеспечения пакета GROMACS. Силовые поля упомянутых 64 липидных молекул были получены с использованием серверов PRODRG и ATB и частично изменены с учетом особенностей липидных молекул. Одновременно мы построили смешанный бислой, используя CHARMM-GUI онлайн генератор сервер, который предназначен для создания липидных бислоев с различными липидными молекулами. Отметим, что последний обеспечивает силовые поля для пакета CHARMM. В результате смешанный бислой минимизировался и уравнивался в течение длительного моделирования.

Компьютерная симуляция – разработка силового поля

Biological membranes are complicated multi-component formations and their futures, such as fusion, ionic transport and interaction with low- and high-molecular compounds strongly depend on the physical properties and state of main constitutes – lipids [1]. It is well known, that lipid components are mixtures of various types of lipids, which have dual chemistry by differing of the polar part and hydrocarbon chains.

Recently, the molecular dynamics (MD) study of mixed lipid bilayer has been attracted much attention and a number of papers are available [2-4], studying cationic, anionic and zwitterionic mixed bilayers. With the increase of computational power, the atomic-level and coarse grained computer simulations have been mainly used to study such systems.

The aim of this paper was the creation of mixed bilayer and force field development following lipid molecules – phosphatidic acid – PA, phosphatidylcholine – PC, phosphatidylethanolamine – PE, phosphatidylglycerole – PG, phosphatidylserine – PS and cholesterol (CL) based on experimental findings [5, 6]. The energy minimization by steepest gradient method was done, after which the system was modeled by normal canonic and isothermal-isobaric ensembles.

Materials and methods. The calculations to derive force fields for some lipids were carried out using Hyperchem 7.5 for Windows (Hypercube Inc.). The MM⁺ and CHARMM force fields were used to optimize the geometry of some lipids and extract the parameters. The MNDO and PM3 semi-empirical methods were used to obtain the partial charges lipids. Simultaneously, the CHARMM-GUI online generator server [7, 8] was used to obtain the force fields for lipids.

The GROMACS software package editconf, genbox and solvate modules were used to construct the final system.

The parallel MD simulation was performed on ArmGrid sites (<http://www.grid.am>).

Results and Discussion. The GROMACS and NAMD software packages were installed on multicore clusters from ArmGrid1 environment for further benchmark testing. As an appropriate package the GROMACS software package have been chosen. It is noteworthy to mention that the hardware and software optimization from parallelization point of view has been also done, taking into account some characteristic specifics of a cluster. A 64 various lipid molecules were built and tested by the GROMACS software package modules. It should be noted that the lipid molecules were compared with lipid molecules from other database, in particularly those of available from <http://www.bioinformatics/downloads/>. Initially, the force fields of lipid molecules were generated using PRODRG2 and ATB3 servers and was partially changed taking into account some features of lipid molecules.

The mixed lipid monolayer was built using GROMACS software package editconf and genbox modules. The asymmetric bilayer was built according to experimental data [7, 9], after which the system was inserted into water bulk using GROMACS software package genbox module. Additionally, we use the VMD software package solvate module. After the creation of mixed bilayers, the sensitivity analysis of cut-off variation, time step changing and testing water models: SPCE and TIP3P and variation of system size have been performed. The final mixed bilayer snapshot is monitored in fig. 1.

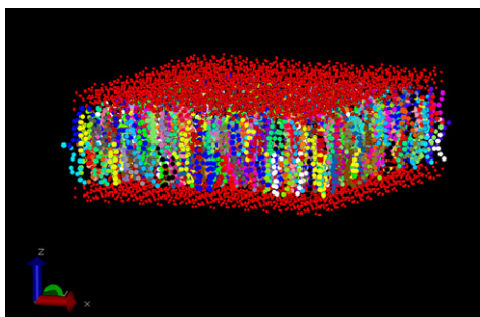


Fig. 1. The cross-sectional view perpendicular to the mixed bilayer plane.

¹ Available at <http://www.grid.am>

² Available at <http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/prodrg/>

³ Available at <http://compbio.biosci.uq.edu.au/atb/>

After construction the whole simulation cell, the energy is minimized using steepest descent method for more than 5000 steps in order to remove high-energy contacts that might have formed during the construction process. The obtained mixed bilayer model was tested in ArmGrid environment clusters in order to check their performance. After minimization the system was modeled by normal canonic ensembles.

We are planning to start simulations as mentioned in project, and to determine fundamental parameters with further comparison to real experiment. Currently, the second stage also involves the molecular dynamics study of multicomponent system at K^+ and Na^+ ionic environment. The MD simulations are planning to carry out on ArmCluster high performance cluster available from ArmGrid environment using 16-32 processors. .

Acknowledgements

This work was supported by ANSEF research grant CHEMEN-3535.

REFERENCES

1. Von Dreele, P.H. Estimation of lateral species separation from phase transitions in nonideal two-dimensional lipid mixtures. *Biochemistry*, 17, 3939-3943, 1978.
2. Pandit, S.A., D. Bostick, and M.L. Berkowitz. Mixed bilayer containing dipalmitoylphosphatidylcholine and dipalmitoylphosphatidylserine: Lipid Complexation, Ion Binding and Electrostatics. *Biophys. J.*, 85, 3120-3131, 2003.
3. de Vries, A.H., A.E. Mark and S.J. Marrink. The Binary mixing behavior of phospholipids in a bilayer: A Molecular Dynamics Study. *J. Phys. Chem. B.*, 108, 2454-2463, 2004.
4. Mori, K., M. Hata, S. Neya, and T. Hoshino. MD simulation of asymmetric phospholipid bilayers with ions and cholesterol. *Chem-Bio Informatics Journal*. 4, 1, 15-26, 2004.
5. Кренич Е.М. Липиды клеточных мембран, Л., Наука, 339 с., 1981.
6. Zakharyan A.E., Ayvazian N.M. Modeling of BLMs in aspect of phylogenetic development of vertebrates. In book: *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, 2 (Edited by A. Ottova-Leitmannova), Elsevier, pp.238-259, 2005.
7. Jo, S., Kim T., V.G. Iyer, and W. Im. CHARMM-GUI: A Web-based Graphical User Interface for CHARMM. *J. Comput. Chem.*, 29, 1859-1865, 2008.
8. S. Jo, J.B. Lim, J.B. Klauda, and W. Im. CHARMM-GUI Membrane Builder for Mixed Bilayers and Its Application to Yeast Membranes. *Biophys. J.*, 97, 50-58, 2009.
9. Закарян А.Е., Айвазян Н.М., Карагезян К.Г. Физико-химические свойства искусственных бислойных мембран из липидов тканей позвоночных. *Докл. РАН*, 388, 1, с.1-3. 2003.

Received on 02.12.2014



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 2(67), 2015

ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ ԵՐԱՆՏԱՎՈՐԸ

(ՀՀ ԳԱԱ ակադեմիկոս Էվրիկ Գեղամի Աֆրիկյանի 90-ամյա հոբելյանի առթիվ)



Հայ ժողովրդի արդի ժամանակաշրջանի հանրաճանաչ գիտնականների շարքում իր արժանավույն տեղն է զբաղեցնում նշանավոր գիտնական, ՀՀ ԳԱԱ ակադեմիկոս, կենսաբանական գիտությունների դոկտոր, պրոֆեսոր, գիտության վաստակավոր գործիչ Էվրիկ Գեղամի Աֆրիկյանը:

Աֆրիկյանը ծնվել է 1925 թ. մայիսի 14-ին Երևանում, բժիշկների ընտանիքում: Ավարտելով միջնակարգ դպրոցը 1942 թ., ընդունվել է Երևանի պետական բժշկական ինստիտուտ: Արդեն ուսանողական տարիներից սկսվում են նրա առաջին քայլերը գիտության բնագավառում: Ուսման հետ միաժամանակ նա աշխատում է կլինիկական վիրաբուժության բաժանմունքում, որտեղ հետազոտություններ իրականացնում է, նվիրված ախտածին մանրէների վրա պենիցիլինի (այն ժամանակ դեռևս քիչ ուսումնասիրված) ազդեցության, ինչպես նաև տարբեր հիվանդությունների բուժման նպատակով նրա կիրառման վերաբերյալ: Ամփոփելով ուսումնասիրության արդյունքները և մինչ այդ հայտնի տվյալները՝ Է. Աֆրիկյանը հրատարակում է «Պենիցիլինը և նրա կիրառումը բժշկության մեջ» (1947 թ.) իր առաջին մենագրությունը, որն այն տարիներին ԽՍՀՄ-ում նշանալից մենագրությունն էր պենիցիլինի վերաբերյալ: Այսպես է սկսվում Էվրիկ Աֆրիկյանի գիտական գործունեությունը:

Ավարտելով ինստիտուտը՝ Է. Աֆրիկյանը 1947 թ. ընդունվում է ասպիրանտուրա և շարունակում իր գիտական գործունեությունը ԽՍՀՄ ԳԱ-ի Միկրոբիոլոգիայի ինստիտուտում՝ անվանի մանրէաբան Ն.Ա. Կրասիլնիկովի ղեկավարությամբ: Ինչպես գրում է ինքը՝ ակադեմիկոս Է. Աֆրիկյանը, այդ տարիները կանխորոշեցին իր հետագա գիտական գործունեությունը:

Ավարտելով ինստիտուտը՝ Է. Աֆրիկյանը 1947 թ. ընդունվում է ասպիրանտուրա և շարունակում իր գիտական գործունեությունը ԽՍՀՄ ԳԱ-ի Միկրոբիոլոգիայի ինստիտուտում՝ անվանի մանրէաբան Ն.Ա. Կրասիլնիկովի ղեկավարությամբ: Ինչպես գրում է ինքը՝ ակադեմիկոս Է. Աֆրիկյանը, այդ տարիները կանխորոշեցին իր հետագա գիտական գործունեությունը:

Սկսվում է գիտական հետազոտությունների նոր, սպորավոր աերոբ մանրէների կենսաբանական առանձնահատկությունների պարզաբանմանը նվիրված բնագավառ, որն այժմ էլ նրա գիտական հետազոտությունների կարևորագույն ուղղություններից մեկն է:

Նշված բնագավառի սկզբնական շրջանի հետազոտությունների արդյունքում Է. Աֆրիկյանին հաջողվեց պարզել հոդում սպորառաջացնող աերոբ մանրէների տարածվածության օրինաչափությունները և նրանց անտագոնիզմի դերը միկրոբիոտների առաջացման գործընթացներում: Ստացված յուրօրինակ արդյունքները Է. Աֆրիկյանն ամփոփեց իր թեկնածուական ատենախոսությունում, որը հաջողությամբ պաշտպանեց 1951 թ.: Նույն թվականին Աֆրիկյանը վերադառնում է Երևան և շարունակում իր գիտական գործունեությունը ՀՀ ԳԱ Միկրոբիոլոգիայի ինստիտուտում, սկզբում որպես գիտաշխատող (1951-1953 թթ.), այնուհետև որպես ինստիտուտի գիտաբարոտղար (1953-1963 թթ.), իսկ 1963թ. նշանակվում է Միկրոբիոլոգիայի ինստիտուտի տնօրեն և ղեկավարում այն շուրջ 38 տարի: 2001 թ. նրան շնորհվում է Միկրոբիոլոգիայի ինստիտուտի պատվավոր տնօրենի կոչում:

Աֆրիկյանն իր աշխատակիցների հետ ձեռնամուխ է լինում ևս մի նոր ուղղության զարգացմանը՝ միջատասպան մանրէների հայտնաբերմանը և նրանց կենսաբանական առանձնահատկությունների լայնածավալ ու մանրակրկիտ ուսումնասիրությանը: Հետազոտությունների արդյունքում անջատվել են *Bacillus thuringiensis* և *B.cereus* ցեղերին պատկանող բազմաթիվ միջատասպան շտամներ, ուսումնասիրվել նրանց մորֆոֆիզիոլոգիական առանձնահատկությունները: Առաջին անգամ ցույց է տրվել, որ միջատաս-

պան Էնդոտոֆսիսի սինթեզը կարգավորվում է պլազմիդների կողմից: Մեկուսացված շտամների միջատասպան, բժշկական և սառնակայան, թունաբանական բազմակողմանի ու բազմաբնույթ հետազոտությունները հնարավորություն ընձեռեցին Է. Աֆրիկյանին աշխատակիցների հետ միասին առավել ակտիվ շտամի (*B. thuringiensis* ssp. *Caucasicus*) օգտագործմամբ ստեղծել մանրէային միջատասպան նոր պատրաստուկ (ԲԻՊ) վնասատու միջատների (թեփուկաթևավորների) դեմ մանրէաբանական պայքարի համար: Գիտնականների խմբին հաջողվեց նաև հայտնաբերել *B. thuringiensis*-ի յուրօրինակ շտամներ, որոնք օժտված են մոծակասպան բարձր ակտիվությամբ: Ստեղծվեց մի նոր պատրաստուկ (ԲԼՊ)՝ մոծակների դեմ մանրէաբանական պայքարի համար: Կազմակերպվեց վերոհիշյալ պատրաստուկների լայնածավալ արտադրությունը և նրանց կիրառումը: Հայտնաբերվեցին նաև այլ վնասատու միջատների դեմ պայքարի ակտիվ շտամներ:

Շնորհիվ Է. Աֆրիկյանի ջանքերի ստեղծվեց միջատասպան մանրէների հարուստ և կարևոր կիրառական նշանակություն ունեցող հավաքածու, որը ներկայումս պահպանվում է Մանրէների ավանդադրման կենտրոնի հավաքածուում:

Միջատասպան մանրէների հետազոտությունների արդյունքներն ամփոփվեցին Աֆրիկյանի ղեկավարական ատենախոսությունում, որը նա հաջողությամբ պաշտպանեց 1970թ. Մոսկվայում: Այնուհետև հրատարակվեց նրա մենագրությունը՝ “Энтомопатогенные бактерии и их значение” (Ереван, 1973):

Բազմակողմանի են ակադեմիկոս Է. Աֆրիկյանի գիտական հետաքրքրությունների շրջանակը: 1975թ. նա նախաձեռնեց և ղեկավարեց հետազոտությունների մի նոր բնագավառ՝ սինթետիկ պոլիմերային նյութերի քայքայումը մանրէների կողմից: Մշակվեց գիտահետազոտական հատուկ նշանակության ծրագիր՝ նվիրված տիեզերական սարքավորումներում օգտագործվող պոլիմերային նյութերի մանրէաբանական քայքայման հարցերի պարզաբանմանը, նրանց երկարադիմացկունության որոշմանը և նոր համակցված երկարադիմացկուն նյութերի ստեղծմանը: Աֆրիկյանի նախաձեռնությամբ Միկրոբիոլոգիայի ինստիտուտում ստեղծվեց նոր հատուկ բաժին, որտեղ իրականացվում էին վերոհիշյալ կարևորագույն հետազոտությունները: Ստեղծվեց նաև մաթեմատիկական հաշվողական կենտրոն՝ հատուկ խնդիրների մշակման և ծրագրավորման համար: Նշված հետազոտությունները հովանավորվում և ֆինանսավորվում էին ԽՍՀՄ-ի «Էներգիա» ԳԱ համալիրի կողմից: Հետազոտությունների արդյունքում հայտնաբերվեցին պոլիմերային նյութերը քայքայող 1000-ից ավել տարբեր ցեղերին պատկանող սնկերի խիստ արժեքավոր շտամներ, որոնք ներկայումս պահպանվում են Մանրէների ավանդադրման կենտրոնի մանրէների Հավաքածուում: Ստեղծվեց որոշակի սնկերից բաղկացած յուրօրինակ ստանդարտ հավաքածու՝ պոլիմերային նյութերի կենսաքայքայման աստիճանի որոշման համար: Պարզաբանվեցին մի շարք օրինաչափություններ՝ մանրէների կողմից պոլիմերային նյութերի քայքայման գործընթացների, ինչպես նաև տիեզերական սարքերում նրանց կիրառման նպատակահարմարության վերաբերյալ:

Վերոհիշյալ հետազոտությունների արդյունքներն ամփոփվեցին հրատարակված մենագրությունում՝ “Afrikan E. (Ed.), Kurakov A., Ghazanchyan N., Goginyan V., Gevorgyan S., Harutyunyan A. Fungal degradants of polymeric materials: Databases and Culture Collection with the Atlas” (Yerevan, 2005, 250 pp.):

Շնորհիվ Աֆրիկյանի հմուտ ղեկավարության, Միկրոբիոլոգիայի ինստիտուտը դարձավ տվյալ բնագավառի առաջատար կազմակերպություն, որը համակարգում էր նշված ուղղությամբ իրականացվող հետազոտությունները ԽՍՀՄ-ում:

Ակադեմիկոս Աֆրիկյանի նախաձեռնությամբ Միկրոբիոլոգիայի ինստիտուտում սկսվեցին մի շարք նոր ուղղություններով մանրէաբանական հետազոտություններ, բացվեցին ֆոտոսինթեզող բակտերիաների, երկրաբանական մանրէաբանության, կենսաքիմիայի, տրանսֆորմացիայի և հյուսվածքային կուլտուրաների լաբորատորիաներ:

Ակադեմիկոս Է. Աֆրիկյանի ջանքերով Աբովյան քաղաքում կառուցվեց նոր համալիր, որը դարձավ ընդհանուր և կիրառական մանրէաբանության առաջատար և լայն ճանաչում գտած գիտական կենտրոններից մեկը:

1993 թ. Աֆրիկյանը հիմնադրեց նաև Մանրէների ավանդադրման կենտրոնը, որտեղ պահվում և ուսումնասիրվում են տարբեր խմբերին պատկանող մանրէների շուրջ 13000 շտամներ: Հավաքածուն ունի կարևոր նշանակություն ոչ միայն հիմնարար հետազոտությունների համար, այլև ունի ռազմավարական նշանակություն և դաս-

վում է ազգային մեծ արժեք ներկայացնող կազմակերպությունների շարքին: Այն ընդգրկված է Մանրենների Համաշխարհային Հավաքածուի (WFCC) կազմում:

Ե. Աֆրիկյանը ղեկավարել է ավելի քան տասը միջազգային գիտական ծրագրեր և պայմանագրեր, որոնք նվիրված են եղել մանրէաբանության արդի խնդիրների ուսումնասիրմանը և ֆինանսավորվել են NACA-ի, ԱՄՆ-ի տարբեր կազմակերպությունների, Եվրոպական Տիեզերական Գործակալության, CRDF-ի, Միջազգային գիտատեխնիկական կենտրոնի և այլնի կողմից:

Շուրջ տասը տարի Ե. Աֆրիկյանի ղեկավարությամբ Միկրոբիոլոգիայի ինստիտուտը համատեղ հետազոտություններ է իրականացրել Գյուլբենկյանի գիտահետազոտական ինստիտուտի հետ (Պորտուգալիա)՝ նվիրված խմորասնկերի և ֆերմենտների առանձնահատկությունների ուսումնասիրությանը: Այդ տարիներին նման համագործակցությունը բացառիկ և արտասովոր երևույթ էր:

Որպես հրավիրված մասնագետ ակադեմիկոս Ե. Աֆրիկյանը գիտահետազոտական աշխատանքներ է իրականացրել ԱՄՆ-ի, Ֆրանսիայի, Կանադայի, Ճապոնիայի, Ավստրալիայի ճանաչված գիտական կենտրոններում: Բազմիցս հանդես է եկել զեկուցումներով տարբեր միջազգային գիտաժողովներում:

Մեծ է ակադեմիկոս Ե. Աֆրիկյանի դերը Հայաստանում մանրէաբանական արդյունաբերության զարգացման գործում: Նրա ակտիվ մասնակցությամբ են հանրապետությունում ստեղծվել լիզինի գործարանը (թ. Չարենցավան), Կենսաքիմիական պատրաստուկների և խմորասնկերի գործարանները (թ. Արմյան):

Ե. Աֆրիկյանը երկար տարիներ եղել է «Հայաստանի կենսաբանական հանդես» ամսագրի գլխավոր խմբագիրը, մի շարք միջազգային գիտական ամսագրերի խորհրդի անդամ:

Նա երկար տարիներ շարունակ ղեկավարել է միկրոբիոլոգիա և կենսատեխնոլոգիա մասնագիտություններով ատենախոսությունների պաշտպանության խորհուրդը: Պատրաստել է բարձր որակավորմամբ մասնագետներ՝ մանրէաբանության և կենսատեխնոլոգիայի բնագավառներում:

Գիտական հասարակությունն արժանի է գնահատել Ե. Աֆրիկյանի բազում տարիների գիտակազմակերպական գործունեությունը: 1971 թ. նա ընտրվել է ՀՀ ԳԱ թղթակից անդամ, իսկ 1982 թ.՝ ակադեմիկոս: 1974 թ. արժանացել է պրոֆեսորի, իսկ 1986 թ. խՍՀՄ գիտության վաստակավոր գործիչի կոչումներին:

Շնորհիվ միջազգային լայն ճանաչման՝ նա ընտրվել է նաև Մանրենների Համաշխարհային Հավաքածուի գործադիր կոմիտեի, Կարգաբանության միջազգային ընկերության գիտականների ասոցիացիայի (INTAS) անդամ:

2009 թ. Ե. Աֆրիկյանը հիմնադրել և մինչ այժմ ղեկավարում է Հայաստանի Մանրէաբանական ասոցիացիան, որը միաժամանակ Մանրէաբանների Եվրոպական Ֆեդերացիայի (FEMS) լիիրավ անդամ է: Ակադեմիկոս Ե. Աֆրիկյանը հեղինակ է 6 մենագրությունների և շուրջ 400 գիտական հոդվածների:

Ակադեմիկոս Ե. Աֆրիկյանը երկարամյա բեղմնավոր գիտակազմակերպական աշխատանքի համար արժանացել է մի շարք կառավարական պարգևների՝ «Պատվո նշան» շքանշան, «Անանիա Շիրակացի» մեդալ, Ս.Պ. Կոռոյովի անվան մեդալ: Որպես Հայրենական Մեծ պատերազմի վետերան պարգևատրվել է «За победу над Германией», «За оборону Кавказа», «Двадцать лет Победы» մեդալներով:

Ներկայումս ակադեմիկոս Ե.Աֆրիկյանը, ջնայած իր պատկառելի տարիքին, շարունակում է իր գիտահետազոտական գործունեությունը Նորաստեղծ ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ում՝ որպես գիտական ղեկավար:

Այսպիսին է գիտության երախտավոր ակադեմիկոս Էվրիկ Գեղամի Աֆրիկյանի բազում տարիների բացառիկ բեղմնավոր գիտակազմակերպական գործունեությունը:

ՀՀ ԳԱԱ ակադեմիկոս Ա.Ս. ՍԱՂՅԱՆ
կ.գ.թ. Լ.Ս. ՄԱՐԿՈՍՅԱՆ

«Հայաստանի կենսաբանական հանդեսի» խմբագրությունը ողջունում է իր նախկին երկարամյա գլխավոր խմբագիր, ակադեմիկոս Էվրիկ Գեղամի Աֆրիկյանի 90-ամյա հոբելյանը, մաղթում առողջություն և ամենայն բարիք:



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 2(67), 2015

ԵՐԵՎԵԼԻ ԳԻՏԵԼԱԿԱՆՆ ՈՒ ՄԱՆԿԱԿԱՐԺԸ

(ՀՀ ԳԱԱ ակադեմիկոս Լիա Լևոնի Օսիպյանի հորեղյանի առթիվ)



Լրացավ ԵՊՀ բուսաբանության և սնկաբանության ամբիոնի պատվավոր վարիչ, կենսաբանության ֆակուլտետի գիտահետազոտական ինստիտուտի գլխավոր գիտաշխատող, կենսաբանական գիտությունների դոկտոր, պրոֆեսոր, ՀՀ ԳԱԱ ակադեմիկոս Լիա Լևոնի Օսիպյանի 85-ամյակը: Լ.Լ. Օսիպյանը ծնվել է 1930 թ. հունվարի 15-ին Երևանում: 1947 թ., ավարտելով միջնակարգ դպրոցը, նա ընդունվում է Երևանի պետական համալսարանի կենսաբանական ֆակուլտետ, որը գերազանցությամբ ավարտում է 1952 թ. և անցնում աշխատանքի համալսարանի բուսաբանության ամբիոնում՝ որպես լաբորանտ: 1954 թ. երիտասարդ Լ.Լ. Օսիպյանն անցնում է ամբիոնում լեկցիոն ասիստենտի պաշտոնի: 1958 թ. ամբիոնի վարիչ, ՀՍՍՀ ԳԱ թղթակից անդամ Դ.Ն. Տետերևնիկովա-Բաբայանի ղեկավարությամբ նա պաշտպանում է թեկնածուական, իսկ 1970 թ.՝ դոկտորական ատենախոսություն: 1961 թ. Լ.Լ. Օսիպյանը, որպես ամբիոնի դոցենտ, դասավանդում է «Բույսերի ձևաբանություն», «Ստորակարգ բույսեր», այնուհետև՝ «Սնկաբանություն» առարկաները: 1972-ին Լ.Լ. Օսիպյանը ստանում է պրոֆեսորի կոչում: 1971 թ. նա ընտրվում է ԵՊՀ բուսաբանության ամբիոնի վարիչ, ղեկավարում ամբիոնը մինչև 2005 թ.: Պրոֆեսոր Լ.Լ. Օսիպյանը 1985-1990 և 1999-2000 թթ. միաժամանակ հանդիսացել է կենսաբանության ֆակուլտետի ղեկան: Նա 1981 թ. արժանացել է ՀԽՍՀ գիտության վաստակավոր գործչի կոչման, 1986 թ.՝ ընտրվել է ՀԽՍՀ ԳԱ թղթակից անդամ, իսկ 1996 թ.՝ ՀՀ ԳԱԱ ակադեմիկոս: 2005 թ. մինչ այժմ Լ.Լ. Օսիպյանը ԵՊՀ բուսաբանության և սնկաբանության ամբիոնի պատվավոր վարիչն է, 2015 թ. ֆակուլտետում գործող գիտահետազոտական ինստիտուտի գլխավոր գիտաշխատողը:

Լ.Լ. Օսիպյանի ամբողջ աշխատանքային գործունեությունն անշեղորեն կապված է Երևանի պետական համալսարանի կենսաբանության ֆակուլտետի հետ, որտեղ նա ձևավորվել է որպես գիտնական և մանկավարժ, անցնելով լաբորանտից մինչև պրոֆեսոր, բուսաբանության ամբիոնի վարիչ, ֆակուլտետի ղեկան: Հատկանշական է, որ Լ.Լ. Օսիպյանը եղել է Երևանի պետական համալսարանում գիտակազմակերպական բաժնի ստեղծման ակտիվներում՝ 1960 թ. դառնալով այդ նորաստեղծ կառույցի առաջին գիտաբարոտղարը:

Պրոֆեսոր Լ.Լ. Օսիպյանի գիտական ողջ գործունեությունը նվիրված է Հայաստանի սնկերի կենսաբազմազանության ուսումնասիրմանը, Հայաստանում սնկաբանության նոր ուղղության՝ փորձարարական սնկաբանության հիմնադրմանը: Սնկերի կազմաբանության, ֆլորիստիկայի, էկոլոգիայի, ֆիզիոլոգիայի բնագավառներում կատարած նրա հիմնարար հետազոտությունները լայն ճանաչում բերեցին գիտնականին ինչպես Հայաստանում, այնպես էլ նրա սահմաններից դուրս՝ հատկապես պերոնոսպորային և հիֆոմիցետային սնկերի ուսումնասիրությունների ուղղությամբ: Նկատի ունենալով այն, որ շատ սապրոտորֆ սնկեր հեշտությամբ տեղափոխվում են միջավայրից միջավայր, ինչը անխուսափելիորեն չի կարող չազդել նրանց ձևաբանական հատկանիշների և կենսաբանական հատկությունների վրա, Լ.Լ. Օսիպյանը հանգեց այն եզրակացությանը, որ սնկի տեսակի նկարագրությունը կարելի է համարել ամբողջական, եթե հաշվի է առնվում տարբեր էկոլոգիական պայմաններում սնկի հատկանիշների և հատկությունների փոփոխականությունը: Սա նոր, ընդհանրական մոտեցում էր տարաբնույթ կենսամիջավայր ունեցող սապրոտորֆ սնկերի ուսումնասիրություններում, ինչը պահանջում է հետազոտման տարբեր մեթոդների կիրառում: Դրանով իսկ Լ.Լ. Օսիպյանի ուսումնասիրությունները ընդգրկեցին սնկաբանության տարբեր ոլորտներ՝ ֆիտոպաթաբանության, հիդրոսնկաբանության, բժշկության, անասնաբուժության, արդյունաբերության բնագավառները:

Տասնամյակների ընթացքում կուտակած փորձառությունը Լ.Լ. Օսիպյանին բերեց համոզման՝ սնկաբանության նշված տարանջատված բնագավառների ինտեգրացման անհրաժեշտության առումով: Նման ինտեգրացման գաղափարն ունեցավ համախոհներ Ռուսաստանի սնկաբանների շրջանում, ինչը հիմք հանդիսացավ 2000 թ. Ռուսաստանի սնկաբանության ակադեմիայի ստեղծման համար, որի հետաքրքրությունների շրջանակում ներառվեց սնկաբանության բոլոր ուղղությունների զարգացումը:

Պրոֆեսոր Լ.Լ. Օսիպյանն առաջինը Հայաստանում ուսումնասիրեց ջրային սնկերը՝ սկզբնավորելով բարձր լեռնային ջրամբարների և հոսքաջրերի հիդրոսնկաբանության նոր ուղղությունը: Հատկանշական էին նրա հետազոտությունները նախորդ դարի 60-70-ականներին բժշկական սնկաբանության ոլորտում՝ նվիրված պոտենցիալ ախտածին սնկերին՝ մարդու տարաբնույթ հիվանդությունների հարուցիչներին, հատկապես ակնաբուժության բնագավառում: Այս հետազոտությունները վկայում էին հիվանդությունների ախտորոշման ընթացքում սնկաբանական ուսումնասիրությունների կարևորության մասին:

Իր գիտական գործունեության ավելի քան երեք տասնամյակ պրոֆեսոր Լ.Լ. Օսիպյանը նվիրել է սննդամթերքի և դեղամիջոցների սնկաբանական անվտանգության հարցերին: Այս աշխատանքներին նպաստեց ամբիոնին կից գիտահետազոտական խմբի ստեղծումը. դեռևս 1981 թ.: Լ.Լ. Օսիպյանի կողմից մշակվեց սննդամթերքի կոնտամինանտ սնկերով աղտոտման փորձաքննության հատուկ սխեմա, որը ներառում էր սննդամթերքի արտադրության ամբողջ ուղին՝ սկսած հումքից, նրա վերամշակումից մինչև պատրաստի մթերքի պահեստավորումը, պահպանումը սառնարաններում, առևտրային ցանցում և տնային պայմաններում: Ուսումնասիրություններն ընդգրկում էին ոչ միայն տեխնոլոգիական պրոցեսի բոլոր փուլերը, այլև սարքավորումների, արտադրական և պահեստային տարածքների օդային միջավայրը՝ որպես պատրաստի սննդամթերքի աղտոտման հնարավոր աղբյուր: Հատկանշական է, որ սննդամթերքում առկա կոնտամինանտ սնկերի թունածին ունակության բացահայտման այս աշխատանքներն առաջին նմանատիպ հետազոտություններն էին ԽՍՀՄ-ում, և պատահական չէր, որ 1980 թ. Երևանում ԽՍՀՄ Բժշկական գիտությունների ակադեմիայի Մուսսման ինստիտուտի հետ մեկտեղ կազմակերպվեց միջազգային դպրոց՝ նվիրված սննդամթերքի միկոտոկսիններով աղտոտման հարցերին: Նույն տարիներին ԽՍՀՄ Պանրի և կարագի համամիութենական ինստիտուտում պրոֆեսոր Լ.Լ. Օսիպյանի ղեկավարած գիտական խմբի կողմից իրականացվում էին ռոկֆոր պանրի գործարաններում *Penicillium roqueforti* սնկի կոլոնիզիոն շտամների մաքրության և թունածին հատկանիշների ուսումնասիրություններ: Այդ աշխատանքների արդյունքների հիման վրա հալած պանրի տեսական և արտադրության տեխնոլոգիայում նախատեսվեցին պանրում բորբոսասնկերի դիասպորների պարունակության թույլատրելի չափաբաժինները, մշակվեցին սննդամթերքի պահանջվող որակն ապահովող պարամետրերը: Այս աշխատանքների արդյունքների հիման վրա կազմվեցին սննդամթերքում բորբոսասնկերի և միկոտոկսինների թունավորության որոշման մեթոդների առաջին պետական ստանդարտները Հայաստանում:

Վերջին 20-25 տարիների ընթացքում, Հայաստանում շուկայական տնտեսության, սեփականության մասնավոր սեկտորի հաստատման հետ կապված վերը նշված հետազոտություններն առավել կարևորություն են ստանում:

Բնական է, որ բեղմնավոր գիտական գործունեությունն ակադեմիկոս Լ.Լ. Օսիպյանը մեծ հաջողությամբ զուգակցել է մանկավարժական աշխատանքի հետ: Նրա գիտակրթական և կազմակերպական ունակությունները ցայտուն դրսևորումներ են ստանում գրեթե 7 տարի ֆակուլտետի ղեկան և շուրջ 35 տարի ամբիոնի վարիչի պաշտոններում: Նա մի քանի տասնամյակ վարել է բուսաբանության և սնկաբանության հիմնական և հատուկ դասընթացները ֆակուլտետում, ԽՍՀՄ տարբեր կլիմայական գոտիներում (Ղրիմ, Սպիտակ ծով, Բելովեժյան թավուտ և այլն), ինչպես նաև Բուլղարիայում կազմակերպել է բուսաբանությամբ մասնագիտացող ուսանողների ուսումնական արակտիկաներ:

Ակադեմիկոս Լ.Լ. Օսիպյանը ավելի քան 400 գիտական աշխատությունների և 6 մենագրության հեղինակ է: Նրա գիտական ուսումնասիրությունների արդյունքները ներկայացվել են տարբեր երկրներում կազմակերպված գիտաժողովներում, նրա անմիջական մասնակցությամբ կազմակերպվել են 4 միջազգային և 2 հանրապետական գիտաժողովներ: Ակադեմիկոս Լ.Լ. Օսիպյանը ղեկավարել է 20 թեկնածուական և դոկտորական ատենախոսություններ:

Լ.Լ. Օսիպյանը նաև ակտիվ հասարակական գործունեություն է ծավալել: Նա Ռուսաստանի բուսաբանական ընկերության անդամ է, «Էկոֆունգ» հայկական սնկաբանական ընկերության փոխնախագահ, Սպառողների ազգային ասոցիացիայի և Սպառողների ազգային ակադեմիայի փոխնախագահ:

Մեծ է և անգնահատելի ակադեմիկոս Լ.Լ. Օսիպյանի ներդրումը հայրենական գիտության զարգացման և բարձրորակ մասնագիտական կադրերի պատրաստման գործում: Այսօր էլ նա լի ավյունով և ոգևորությամբ շարունակում է իր գիտելիքները փոխանցել երիտասարդ գործընկերներին, ուսանողությանը: Մաղթում ենք վաստակաշատ գիտնականին քաջ առողջություն և ամենայն բարիք:

**ՀՀ ԳԱԱ թղթակից անդամ Է.Ս.ԳԵՎՈՐԳՅԱՆ,
պրոֆեսոր Ս.Գ.ՆԱՆԱԳՅՈՒՆՅԱՆ**

«Հայաստանի կենսաբանական հանդեսի» խմբագրությունը շնորհավորում է ակադեմիկոս Լ.Լ.Օսիպյանին հոբելյանի առթիվ և սիրով միանում նրան ուղղված մաղթանքներին: