



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



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

ՀԱՏՈՐ LXVII, 4, 2015

ՀՀ ԳԱԱ «Գիտություն» հրատարակչություն

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, Ժ.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. Бояджян (*заместитель главного редактора*),
Ա.Գ. Есаян (*ответственный секретарь*), Գ. Գ. Գеворкян, Ա.Ա. Трчунян,
Լ.Ր. Манвелян, Ս.Х. Маýрапетян, 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 •

Հակոբյան Լ.Լ. Չորացրած խաղողից անջատված միցելիալ սնկերի տոքսիկության որոշումը կենսաբանական թեստավորման մեթոդով.....	6
Դյուկովա Կ.Գ., Իզմաիլյան Մ.Ս., Մանուկյան Լ.Ս., Ղուկասյան Վ.Տ. Գետնախնձորից (<i>Helianthus tuberosus</i>) ինուլինազի անջատման օպտիմալ պայմանների մշակում.....	11
Պողոսյան Գ.Յ. Աճեցման պայմանների ազդեցությունը ծիրանենու տնկիների ստացման արդյունավետության վրա բացօթյա հիդրոպոնիկայի պայմաններում.....	17
Մայրապետյան Ս.Խ., Ալեքսանյան Ջ.Ս., Դարյադար Մ.Խ., Թովմասյան Ա.Հ., Ստեփանյան Բ.Թ. Պղպեղային դադձի եթերայուղի քանակական և որակական ցուցանիշների համեմատական բնութագիրը աճեցման տարբեր պայմաններում.....	21
Նիկոլյան Ա.Ա., Թումանյան Լ.Ռ. Առնետի որոշ օրգանների օրնիտինկարբամոլիտրանսֆերազային և արգինազային ակտիվությունը A ₆ (25-35) ամփոփողային պեպտիդի երկկողմանի ինտրացերեբրավենտրիկուլային ներարկման պայմաններում.....	26
Հովհաննիսյան Ն.Ա. Նոր տվյալներ հակաբիոտիկներ ձևափոխող ֆերմենտների արգելակիչների վերաբերյալ.....	31
Չոբանյան Ա.Ս., Գրիգորյան Ա.Լ., Մելքոնյան Ա.Ա., Մկրտչյան Օ.Ա. Աստրոցիտի վարքագծի համակարգչային մոդելավորումը պոստսինապտիկ նեյրոնի կալցիումի տատանումների տարբեր պայմաններում.....	38
Չիչեք Ե., Ավսար Դ. Լեսեփայան ձկներ՝ հատակի ձկնորսացանցով ձկնորսության ժամանակ Բաբադիլիմանի մոտ՝ Թուրքիայի հյուսիս-արևելյան միջերկրածովյան ափին.....	43
Մուխամեդյան Ժ.Հ., Պողոսյան Գ.Հ., Վարդանյան Պ.Հ. Կադմիումի իոնների ազդեցությունը ցորենի (<i>Triticum aestivum</i> L.) աճող ծիլերում լիպիդների պերօքսիդացման և հակաօքսիդանտային ֆերմենտների ակտիվության վրա.....	51
Մավրիկով Պ.Ն. Լյարդի ռեզեկցիայի ազդեցությունը փայծաղում ազոտային նյութափոխանակության վրա քրոնիկ տետրաքլորմեթանային հեպատիտի դեպքում.....	58

• Համառոտ հաղորդումներ •

Միմոնյան Ա.Է., Գևորգյան Ա.Լ., Մինասյան Ս.Հ., Մարգարյան Ա.Ա., Առաքելյան Մ.Ս. Հողի տարբեր աստիճանի աղտոտվածությամբ վայրերից <i>D.Raddei</i> մողեսների ԴՆԹ-ի վնասվածքների վերլուծությունը.....	65
Գյուլխանդանյան Ա.Գ. Կատիոնային պորֆիրինների ադսորբցիան ցեոլիտով և արծաթե նանոմասնիկներով	68
Թերլեմեզյան Հ.Լ., Մարգարյան Լ.Խ. Լուլիկի ցեցի ձևաբանական և կենսաբանական առանձնահատկությունները Արարատյան հարթավայրի պայմաններում.....	71

СОДЕРЖАНИЕ

•Экспериментальные и теоретические статьи•

<i>Акопян Л.Л.</i> Определение токсичности мицелиальных грибов, выделенных из сушеного винограда, методом биотестирования.....	6
<i>Дюкова К.Г., Измаилян М.С., Манукян Л.С., Кочикян В.Т.</i> Разработка оптимальных условий выделения инулиназы из клубней топинамбура (<i>Helianthus tuberosus</i>) ...	11
<i>Погосян Г.Ю.</i> Влияние условий выращивания на продуктивность получения саженцев абрикоса в условиях открытой гидропоники.....	17
<i>Майрапетян С.Х., Алексанян Дж.С., Дарядар М.Х., Товмасын А.О., Степанян Б.Т.</i> Сравнительная характеристика количественных и качественных показателей эфирного масла мяты перечной при различных условиях выращивания.....	21
<i>Никоян А.А., Туманян Л.Р.</i> Орнитинкарбамоилтрансферазная и аргиназная активность некоторых органов крыс в условиях двусторонней интрацеребровентрикулярной инъекции амилоидного пептида A _β (25-35).....	26
<i>Оганесян Н.А.</i> Новые данные об ингибиторах ферментов, модифицирующих антибиотики.....	31
<i>Чобанян А.С., Григорян А.Л., Мелконян А.А., Мкртчян О.А.</i> Компьютерное моделирование поведения астроцита при различных условиях кальциевых колебаний постинаптического нейрона.....	38
<i>Чичек Е., Авсар Д.</i> Лесепсионные рыбы при рыболовстве донным тралом у Бабадильмани байт, Северо-восточного средиземноморского побережья Турции.....	43
<i>Мухаелян Ж.А., Погосян Г.А., Вардеванян П.О.</i> Влияние ионов кадмия на перекисное окисление липидов и активность антиокислительных ферментов в проростках пшеницы (<i>Triticum aestivum</i> L.)	51
<i>Савилов П.Н.</i> Влияние резекции печени на азотистый метаболизм в селезенке при хроническом тетрахлорметановом гепатите.....	58

•Краткие сообщения•

<i>Симонян А.Э., Геворкян А.Л., Минасян С.Г., Саргсян А.А., Аракелян М.С.</i> Анализ повреждений ДНК у ящериц <i>d.raddei</i> , обитающих в зонах с различным уровнем загрязнения почв, методом ДНК-комет.....	65
<i>Гюльханданян А.Г.</i> Адсорбция катионных порфиринов наночастицами цеолита и серебра.....	68
<i>Терлемезян Г.Л., Саргсян Л.Х.</i> Морфологические и биологические особенности томатной моли в условиях Араратской равнины.....	71

CONTENTS

•Experimental and theoretical articles•

<i>Hakobyan L.L.</i> Detection of toxicity of filamentous fungi isolated from dried vine fruit by biotest method	6
<i>Dyukova K.G., Izmailyan M.S., Manukyan L.S., Kochikyan W.T.</i> Development of optimal conditions for the isolation of inulinase from jerusalem artichoke tubers (<i>Helianthus tuberosus</i>)	11
<i>Poghosyan G.Y.</i> Influence of cultivation conditions on productivity of apricot saplings in open-air hydroponic conditions.....	17
<i>Mairapetyan S.Kh., Alexanyan J.S., Daryadar M.Kh., Tovmasyan A.H., Stepanyan B.T.</i> Comparative description of essential oil quantitative and qualitative indices of peppermint in different cultivation conditions.....	21
<i>Nikoyan A.A., Tumanyan L.R.</i> Ornithinecarbamoyltransferase and arginase activity in rat some organs at bilateralintracerebroventricular amyloid peptide A β (25-35) injection..	26
<i>Hovhannisyan N.A.</i> New data on the inhibitors of antibiotic modifying enzymes.....	31
<i>Chobanyan A.S., Grigoryan A.L., Melkonyan A.A., Mkrtchyan O.A.</i> Computer modeling of the astrocyte behavior in different conditions of calcium oscillations postsynaptic neuron.....	38
<i>Çiçek E., Avsar D.</i> Lessepsian fishes at the bottom trawl fishery in the Babadillimani bight, northeastern mediterranean coast of Turkey.....	43
<i>Mukhaelyan Zh.H., Poghosyan G.H., Vardevanyan P.H.</i> Effect of cadmium ions on lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes of growing wheat (<i>Triticum aestivum</i> L.) shoots.....	51
<i>Savilov P.N.</i> The impact of liver resection on nitrogen metabolism in spleen during the chronic tetrachlorcarbon hepatitis.....	58

• Short communications •

<i>Simonyan A.E., Gevorgyan A.L., Minasyan S.H., Sargsyan A.A., Arakelyan M.S.</i> Analysis of DNA damage in lizards <i>D.raddei</i> , from areas with different levels of soil contamination using comet assay.....	65
<i>Gyulkhandanyan A.G.</i> Adsorption of cationic porphyrins by nanoparticles of zeolite and silver.....	68
<i>Terlemezyan H.L., Sargsyan L.X.</i> The morphological and biological characteristics of the tomato moth in the Ararat valley.....	71



Biolog. Journal of Armenia, 4 (67), 2015

DETECTION OF TOXICITY OF FILAMENTOUS FUNGI ISOLATED FROM DRIED VINE FRUIT BY BIOTEST METHOD

L.L. HAKOBYAN

Yerevan State University, Department of Microbiology and
Biotechnology of Plants and Microbes
lusinehl@yahoo.com

Dried vine fruit is a favorable substrate not only for growth of toxigenic fungi but for toxin synthesis since it contains enough humidity and sugars. The results of our research have shown high contamination level of dried vine fruit by ochratoxigenic and aflatoxigenic fungi from genus *Aspergillus*. Toxigenic potential of 75 strains from *Aspergillus* genera: 30 - *A. carbonarius*, 15 - *A. niger*, 10 - *A. sclerotium*, 5 - *A. lacticoffeatus*, 3 - *A. ochraceus* and 12 - *A. flavus*, was studied. The biotest was carried out on Brine Shrimp (*Artemiasalina*) Larvae. 20 strains of *A. carbonarius*, 6 - of *A. niger* and 2 - *A. sclerotium* shown toxicity of different degree. All the rest did not show any toxic properties. Eight of 12 analyzed *A. flavus* strains were toxic.

Aspergillus genera – ochratoxigenic – aflatoxigenic – fungi – strains

Չորացրած խաղողը բարենպաստ սուբստրատ է հանդիսանում ոչ միայն տոքսիգեն սնկերի աճի, այլ նաև նրանց կողմից տոքսինների սինթեզի համար, քանի որ պարունակում է բավարար քանակությամբ խոնավություն և շաքարներ: Մեր հետազոտության արդյունքները ցույց տվեցին չորացրած խաղողի բարձրաստիճան աղտոտվածության՝ *Aspergillus* ցեղին պատկանող օրրատոքսիգեն և աֆլատոքսիգեն սնկերով: Ուսումնասիրվել է *Aspergillus* ցեղին պատկանող 75 շտամների. (30 – *A. carbonarius*, 15 – *A. niger*, 10 – *A. sclerotium*, 5 – *A. Lacticoffeatus*, 3 – *A. ochraceus* և 12 – *A. flavus*), տոքսիգեն պոտենցիալը *Artemiasalina* խոիկատոն խեցգետնակերպ թրթուրների նկատմամբ: Տոքսիկ հատկություններ դրսևորել են *A. Carbonarius*-ի 20, *A. Niger*-ի 6 և *A. Sclerotium*-ի 2 շտամներ: Մնացած շտամները որևէ տոքսիկ հատկություն չեն դրսևորել: Ուսումնասիրված *A. flavus*-ի 12 շտամներից 8 –ը եղել են տոքսիկ:

Ցեղ *Aspergillus* – օքրատոքսիգեն – աֆլատոքսիգեն – սնկեր – շտամներ

Сушеный виноград является благоприятным субстратом не только для роста токсигенных грибов, но и для их токсинообразования, так как содержит достаточное количество влаги и сахаров. Результаты наших исследований показали на высокую степень контаминации сушеного винограда охратоксигенными и афлатоксигенными грибами из рода *Aspergillus*. Исследован токсигенный потенциал у 75 штаммов из рода *Aspergillus*: 30 – *A. carbonarius*, 15 – *A. niger*, 10 – *A. sclerotium*, 5 – *A. Lacticoffeatus*, 3 – *A. ochraceus* и 12 – *A. flavus*. Биотестирование проводили на личинках жабраногого рачка *Artemiasalina*. 20 штаммов вида *A. carbonarius*, 6 штаммов *A. niger* и 2 штамма *A. sclerotium* проявили токсичность в разной степени. Остальные штаммы не проявили токсичных свойств. Из исследованных 12 штаммов *A. flavus* 8 оказались токсичными.

Под *Aspergillus* – охратоксигенные – афлатоксигенные – грибы – штаммы

Species from *Aspergillus* section *Nigri*: *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. tubingensis* are the main fungi producing OTA (ochratoxin A) in grape and raisin. The problem of the

contamination of dried vine fruit by ochratoxin A is studied in many countries with developed viticulture and winemaking: in Spain [6], France [18], Italy [5], Portugal [21], Argentina [14] and Australia [13]. In these studies it is remarked that most of ochratoxigenic strains belong to *A. carbonarius* species. Small amount of strains belonging to *A. niger* species produced OTA. As it was shown in researches the presence of ochratoxin A in raisin samples is mainly associated with *A. carbonarius* species in California as well [15].

During mycological analyses of corinthian raisin (currant) spent in Greece the authors revealed a high contamination level of raisin by species *Aspergillus spp.* among which *A. niger* and *A. carbonarius* were dominated [22]. Most of *A. carbonarius* strains produced OTA. The results of analyses of dried vine fruit (currant, sultana and raisin) in Spain have shown domination of *A. niger* (98%) and *A. carbonarius* (58%) species [3]. 96.7% of all isolated *A. carbonarius* strains and just 0.6% of *A. niger* strains produced OTA.

Recently they repeatedly reported about contamination of dried vine fruit by aflatoxigenic species of *A. flavus* [4, 12]. In most cases *A. flavus* is considered to be one of the most frequent occurring after *A. niger* and *A. fumigatus* species contaminating dried vine fruit [10]. The presence of *A. flavus* species in dried vine fruit is a risk from point of view a possibility of product contamination by aflatoxins.

Materials and methods. 167 samples of dried vine fruit (white and black types of raisin and sultana) were analyzed. 87 of all analyzed samples were Armenian produced and 80 – imported from different countries. The samples were collected from different markets in Yerevan city according to GOST 1750-86 [2] and EC 2006b (No 401/2006) [9]. Following nutrient mediums were used: CYA (Chapek-Yeast Agar medium, HiMedia Ltd.), GYA (Glucose-Yeast Agar medium, HiMedia Ltd.), and MEA (Malt-Extract Agar medium, HiMedia Ltd.). Mycological analyses dried vine fruit samples were carried out with direct plating and dilution plating methods [16]. Identification of isolated micromycetes cultures was spent based on macro- and microscopic characteristics according to Beelay V.I. [1], Raper K.B. and Fennell D.I. [17], Samson R.A. et al. [19], [20].

Determination of toxicity of micromycetes extracts and culture fluid was spent on Brine Shrimp (*Artemiasalina*) Larvae which are sensitive to toxic metabolites of filamentous fungi [8], [11]. The toxicity degree of fungi extracts and culture fluid was assessed by percentage mortality of larvae. Nontoxic extracts caused death to 9% of the larvae, slightly toxic – 10 to 49%, toxic – from 50 to 89%, very toxic – from 90 to 100%. Death of 1% larvae is allowed in control version. For biotest on larvae three replications have been used.

Results and Discussion. As the results of mycological analyses of 167 dried vine fruit samples in different type realizing in Armenia 508 strains potential producers of OTA and aflatoxins from *Aspergillus* genera were isolated. These strains belong to *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. sclerotium*, *A. ochraceus*, *A. lacticoffeatus* and *A. flavus* species. From total number of isolated strains 61.8% of *A. carbonarius* species and 46.7% of *A. niger* species respectively were isolated from Armenian dried vine fruit samples.

The toxigenic potential of 75 strains from *Aspergillus* genera was studied. The toxicity of their culture fluids and chloroform extracts was determined. Fungi extracts was prepared by incubating them on Chapek – Docs liquid nutrient medium. Toxigenic potential of 30 *A. carbonarius* strains isolated from dried vine fruit samples was detected (tabl. 1).

20 *A. carbonarius* strains of all 30 analyzed were isolated from Armenian black dried vine fruit. 16 strains showed different degree of toxicity. Six *A. carbonarius* strains of all 10 isolated from imported samples were nontoxic and 4 showed slightly toxic properties (table 1). Five *A. niger* strains of all isolated from imported samples were analyzed. Three showed slightly toxic properties and two were nontoxic (tabl. 1).

Ten strains of *A. niger*, 10 – *A. sclerotium*, 5 – *A. lacticoffeatus* and 3 – *A. ochraceus*, isolated from Armenian dried vine fruit samples were analyzed. Slightly toxic properties were detected in 3 *A. niger* strains and 2 *A. sclerotium* strains. All of *A. lacticoffeatus* and *A. ochraceus* strains were nontoxic (tabl. 1).

Table 1. Results of biotest of ochratoxigenic strains isolated from dried vine fruit samples on *Artemiasalina* Larvae

Number of analyzed strains	Strains	Number of strains with toxicity in different degree							
		Toxicity of culture fluid				Toxicity of chloroform extract			
Strains isolated from local produced sample		A	B	C	D	A	B	C	D
20	<i>A. carbonarius</i>	4	8	4	4	4	8	4	4
10	<i>A. niger</i>	0	0	3	7	0	0	3	7
10	<i>A. sclerotiniger</i>	0	0	2	8	0	0	2	8
5	<i>A. lacticoffeatus</i>	0	0	0	5	0	0	0	5
3	<i>A. ochraceus</i>	0	0	0	3	0	0	0	3
Strains isolated from imported samples		A	B	C	D	A	B	C	D
10	<i>A. carbonarius</i>	0	0	4	6	0	0	4	6
5	<i>A. niger</i>	0	0	3	2	0	0	3	2

Note hereinafter: according to Brown [8], Harwing, Scott [11] and Biji [7],

A= very toxic extracts of fungi cause the death of larvae from 90% to 100%,

B= toxic – from 50 to 89%,

C= slightly toxic – from 10 to 49%,

D= nontoxic – up to 9%.

67 *A. flavus* strains potential producers of aflatoxins were isolated from dried vine fruit samples. The presence of aflatoxin B₁ was studied in 12 *A. flavus* strains by biotest method (fig. 1). Very toxic properties were revealed in 3 *A. flavus* strains. Four strains caused the death of 75% of larvae. Slightly toxicity was detected in 1 strain. All the remainder 4 strains were nontoxic.

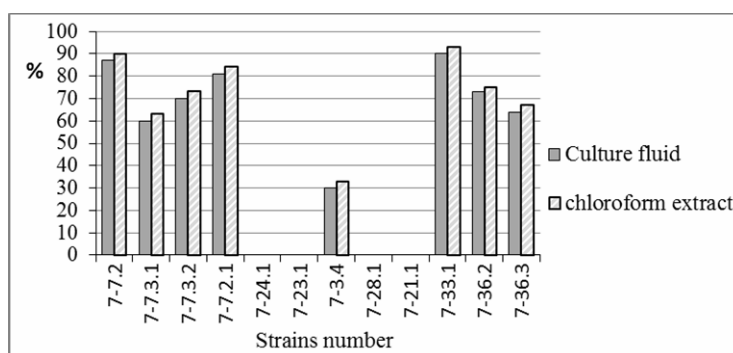


Fig. 1. Toxicity of extracts and culture fluid of *A. flavus* strains isolated from dried vine fruit by biotest

Our studies have shown that there is a risk of contamination of dried vine fruit by ochratoxigenic and aflatoxigenic fungi. Most of the *A. carbonarius* strains we analyzed produced ochratoxin A. The risk of contamination of product named above by *A. flavus* aflatoxigenic fungi is high either. Based on the fact that dried vine fruit is a good substrate for not only fungal growth but also toxin production, the risk of accumulation of

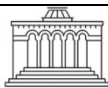
OTA and aflatoxin B₁ in dried product increases. Thus, controlling the contamination level of dried vine fruit by *A. flavus* and *A. carbonarius* species is a primary task for countries with developed viticulture including Armenia. Especially considering the fact that in our country there are no regulations for OTA and aflatoxins in grapes products.

REFERENCES

1. Билай В.И., Коваль Э.З. Аспергиллы. Определитель. Киев. Наукова думка. 1988.
2. ГОСТ 1750-86 Фрукты сушеные. Правила приемки, методы испытаний. Госстандарт СССР. 17.01.1986.
3. Abarca ML, Accensi F, Bragulat MR, Castellá G, Cabañes FJ. *Aspergillus carbonarius* as the main source of ochratoxin A contamination in dried vine fruits from the Spanish market. J Food Prot. 66, 3, p. 504-506, 2003.
4. Anwar K., Kumari K., Jaiswal S., Keshari S., Menta A.. Isolation of toxigenic mycoflora from potential edible sources and study of the susceptibility to produce aflatoxin. International Journal of Pharma and Bio Sciences. 4, 1, p. 86-94, 2013.
5. Battilani P., Giorni P., Bertuzzi T., Formenti S., Pietri A. Black aspergilli and ochratoxin A in grapes in Italy. Int. J. Food Microbiol. 111, p. S53-S60, 2006.
6. Bau M., Bragulat M.R., Abarca M.L., Minguez S., Cabañes F.J. Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes. Int J Food Microbiol. 9, p. 125-130, 2005.
7. Biji J., Dive D., Van Pelegheim C. Comparison of some bioassay methods for mycotoxin studies. Environ Pollut A Ecol. Biol. 26, p. 173-182, 1981.
8. Brown R.F. The effect of some mycotoxins on the brine shrimp *Artemiasalina*. J.A.O.A.C. 46, p.11, 1969.
9. EC. 2006b. Commission Regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. Official Journal of the European Union. L70. 9, 3. p.12-34, 2006.
10. Giridhar P., Reddy S.M. Incidence of mycotoxigenic fungi on raisins. Current Advances in Plant Science. 14, p. 291-294, 2001.
11. Harwing J, Scott P.M. Brine Shrimp (*Artemiasalina*) Larvae as a Screening System for Fungal Toxins. Applied Microbiology. 21, 6, p. 1011-1016, 1971.
12. Hussein A.M., Sommer N.F., Fortlage R.J. Suppression of *Aspergillus flavus* in Raisins by Solar Heating During Sun Drying. Postharvest Pathology and Mycotoxins. 76, 1986.
13. Leong S.L., Hocking A.D., Pitt J.I., Kazi B.A., Emmett R.W., Scott E.S. Australian research on ochratoxigenic fungi and ochratoxin A. Int J Food Microbiol 111. Suppl 1. p. S10-S17, 2006.
14. Magnoli C, Violante M, Combina M, Palacio G., Dalcerio A. Mycoflora and ochratoxin-producing strains of black aspergilli in wine grapes in Argentina. Letters in Applied Microbiology. 37, pp. 179-184, 2003.
15. Palumbo J.D., O'Keeffe T.L., Vasquez S.J. and Mahoney N.E. Isolation and identification of ochratoxin A-producing *Aspergillus* section *Nigri* strains from California raisins. Letters in Applied Microbiology. 52, p. 330-336, 2011.
16. Pitt JI., Hocking A.D. Fungi and Food Spoilage. 2nd Edition. Blackie Academic and Professional. London, 1997.
17. Raper K.B. and Fennell D.I. The genus *Aspergillus*. Robert E. Krieger Publishing. Co. Inc. Florida. USA, 1977.
18. Sage L., Krivobok S., Delbos E., Seigle-Murandi F., Creppy E.E. Fungal flora and ochratoxin A production in grapes and musts from France. J. Agric. Food Chem. 50, p. 1306-1311, 2002.
19. Samson R.A., Houbraken J.A., Kuijpers F.A., Frank J.M., Frisvad J.C. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. In Studies in Mycology. 50. p. 45-61, 2004.
20. Samson R.A., Noonim P., Meijer M., Houbraken J., Frisvad J.C., Varga J. Diagnostic tools to identify black aspergilli. In Mycology, 59, 13, p. 129-145, 2007.

21. Serra R., Abrunhosa L., Kozakiewicz Z., Venâncio A. Black *Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. *Int. J Food Microbiol.* 88, p. 63-68, 2003.
22. Tjamos S.E., Antoniou P.P., Kazantzidou A., Antonopoulos D.F., Papageorgiou I., Tjamos E.C. *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* in Corinth Raisin and Wine-Producing Vineyards in Greece: Population Composition, Ochratoxin A Production and Chemical Control. *Journal of Phytopathology*, 152. Issue 4. p. 250-255. 2004.

Received on 16.09.2015



Биол. журн. Армении, 4 (67), 2015

РАЗРАБОТКА ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ ВЫДЕЛЕНИЯ ИНУЛИНАЗЫ ИЗ КЛУБНЕЙ ТОПИНАМБУРА (*HELIANTHUS TUBEROSUS*)

К. Г. ДЮКОВА, М. С. ИЗМАИЛЯН, Л. С. МАНУКЯН, В. Т. КОЧИКЯН

НПЦ “Армбиотехнология” НАН РА
karina_dukova@yahoo.com

Приведены результаты исследований по разработке оптимальных условий выделения инулиназы из клубней топинамбура (*Helianthus tuberosus*). Выявлен наиболее эффективный экстрагент, способствующий максимальному переходу белков в раствор, осуществлено концентрирование экстракта растворимого белка с полным сохранением его ферментативной активности. Выделены три изофермента инулиназы с разной степенью очистки, гидролизующие инулин с активностью $I_1=0,0175$ Ед/мг, $I_2=0,0083$ Ед/мг, $I_3=0,00450$ Ед/мг.

Инулин – топинамбур (Helianthus tuberosus) – инулиназа

Աշխատանքում ներկայացված են գետնախնձորից (*Helianthus tuberosus*) ինուլինազի անջատման համար օպտիմալ պայմանների որոշմանն ուղղված հետազոտության արդյունքները: Հետազոտության ընթացքում հայտնաբերվել է ամենաարդյունավետ էքստրագենտը, որը նպաստում է լուծույթում սպիտակուցների առավելագույն տարանջատմանը: Իրականացվել է լուծվող սպիտակուցի էքստրակտի խտացումը՝ ամբողջապես պահպանելով նրա ֆերմենտային ակտիվությունը: Տարանջատվել են մաքրման տարբեր աստիճաններով ինուլինազի երեք իզոֆերմենտ, որոնք ինուլինը ենթարկում են հիդրոլիզի հետևյալ ակտիվությամբ՝ $I_1=0,0175$ Միավոր/մգ, $I_2=0,0083$ Միավոր/մգ, $I_3=0,00450$ Միավոր/մգ:

Ինուլին – գետնախնձոր (Helianthus tuberosus) – ինուլինազ

The results of studies on the development of optimal conditions for the isolation of inulinase from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) are presented. The most effective extragent has been identified, which promoted to the highest possible extraction of proteins in the solution. Three isoenzymes of the inulinase have been isolated with various degrees of purification that hydrolyzed inulin with the following activity $I_1 = 0,0175$ U/mg, $I_2 = 0,0083$ U/mg, $I_3 = 0,00450$ U/mg.

Inulin – Jerusalem artichoke (Helianthus tuberosus) – inulinase

Инулиназы (2,1-β-D-фруктан фруктаногидролазы) составляют важнейший класс ферментов для получения фруктозы, глюкозы и инуло-олигосахаридов, которые интенсивно используются в фармацевтической и пищевой индустрии. Описано три типа инулиназ, включая эндо-инулиназы, экзо-инулиназы и фруктофуранозидазы (инвертазы), которые не являются обычными катаболическими кар-

богидратазами. В основной ферментативной реакции участвуют главным образом два фермента, которые катализируют гидролиз инулина и их подразделяют на две группы по типу воздействия на инулин. Экзо-инулиназы (ЕС 3.2.1.80) отщепляют концевой фрагмент фруктозы от молекулы инулина; эндо-инулиназы (ЕС 3.2.1.7), в результате гидролиза внутренней связи в молекуле инулина образуют различные олигосахариды, которые являются растворимыми пищевыми волокнами и функциональными подсластителями [3, 11]. Инулиназы широко распространены среди высших растений и микроорганизмов. Процесс получения инулиназ из грибов, дрожжей и бактерий хорошо изучен и широко представлен в литературе [2, 5-7, 9]. В настоящее время существуют высокоактивные ферментные препараты инулиназ, способствующие превращению инулинсодержащего сырья во фруктозиды различной степени полимеризации. Растительные инулиназы менее изучены и результаты по их исследованию представлены лишь в двух ранних работах [4, 10]. В настоящее время физиологическая роль растительных инулиназ все еще окончательно не выяснена. Предполагается, что изменение углеводного состава клубней в процессе зимнего хранения происходит не без участия гидролитических ферментов – инулиназ.

Слабый интерес, проявляемый к растительным инулиназам, в основном обусловлен сложностью работы с растительными экстрактами и низким содержанием белка в растительном сырье.

Целью данной работы являлось определение оптимальных условий выделения инулиназы из клубней топинамбура (*Helianthus tuberosus*).

Материал и методика. Клубни топинамбура (*Helianthus tuberosus*) были выращены в открытой почве в окрестностях г. Еревана (Армения), выкопаны в октябре-ноябре и хранились в течение недели в холодильнике при температуре 4-5⁰ С до момента использования. Инулин, применяемый в качестве субстрата, был получен из клубней топинамбура в лаборатории биотрансформации НПЦ “Армбиотехнология” НАН РА. В работе использовали следующие реактивы: ДЕАЕ-целлюлоза, 2-меркаптоэтанол (Serva, Германия). Все остальные реактивы марки х.ч. – коммерчески доступные, производства Армении и стран СНГ.

Приготовление грубого ферментного экстракта. Клубни топинамбура тщательно очищали, промывали под проточной водой и разрезали на мелкие кусочки с помощью ножа. Измельченные кусочки заливали экстрагирующим раствором в соотношении 1:3 и проводили гомогенизацию в стационарном блендере (Ufesa, Испания). Далее гомогенат инкубировали на термостатируемой круговой качалке со скоростью вращения 180 об/мин в течение 2 ч при температуре 37⁰С, после чего отфильтровывали через 6 слоев марли. Фильтрат центрифугировали при 4000 об/мин 40 мин (центрифуга К-26, Германия), а полученный супернатант пропускали через ацетатный фильтр на фарфоровой воронке под вакуумом для получения прозрачного экстракта. Полученный экстракт концентрировали путем пропускания его через разделительный ультрафильтрационный аппарат с полыми волокнами AP-02м (Россия) периодического действия. Рабочая смесь циркулировала по замкнутому контуру, омывая наружную поверхность волокна, а по его внутреннему каналу выводился фильтрат. Каждую порцию фильтрата анализировали на содержание белка и сахаров. В результате фильтрации получили максимально сконцентрированный белковый экстракт.

Все дальнейшие работы по выделению и очистке инулиназы топинамбура проводились при температуре 4⁰С.

Выделение и очистка инулиназы из клубней топинамбура (*H. tuberosus*). К полученному раствору концентрированного белкового экстракта добавляли кристаллы сульфата аммония до 90% насыщения и оставляли в холодильнике на час. Выпавший осадок центрифугировали 25 мин при 10000 об/мин (центрифуга К-24, Германия), растворяли в буфере I (20 мМ К₂Na-фосфатный буфер pH 7,0, содержащий 5 мМ меркаптоэтанол) и диализовали против 10 объемов буфера II (2 мМ К₂Na-фосфатный буфер pH 7,0, содержащий 5 мМ меркаптоэтанол) в течение суток, дважды меняя раствор буфера. Диализат фуговали и проводили выделение инулиназы.

Ионообменная хроматография. Колонка (25x310 мм) содержала ДЕАЕ-целлюлозу, уравновешенную буфером I. Элюцию проводили линейным градиентом концентрации хлористого натрия (0-1 М) в буфере I. Активные фракции собирали по 8-10 мл автоматическим коллектором “Isko” (США).

Измерение инулиназной активности. Для определения инулиназной активности к 0,9 мл 1 %-ного раствора инулина (0,2 М Na-ацетатный буфер, pH 5,0) приливали 0,1 мл исследуемого раствора фермента, перемешивали и инкубировали при температуре 37⁰С в течение 10 ч. Количество образовавшихся редуцирующих сахаров определяли модифицированным методом Шомоди-Нельсона [8, 12]. За единицу инулиназной активности принимали количество фермента, катализирующего образование 1 мкмоль фруктозы в минуту.

Определение концентрации белка. Концентрацию белка определяли методом Бредфорда по поглощению комплексов фермент – кумасси бриллиантовый синий при длине волны 595 нм [1] с использованием в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин.

Выход белка контролировали последовательным измерением оптической плотности элюатов колонн при 280 нм [13].

Результаты и обсуждение. В процессе выделения и очистки инулиназы нами сочетались методы экстракции (перевод белков в растворенное состояние 0,9 %-ным раствором хлористого натрия, который обеспечивает наряду с растворением стабилизацию белка); методы фугации, фильтрации и ультрафильтрации через полые волокна (для получения концентрированного белкового экстракта), методы высаливания и центрифугирования (образование осадка при 90% насыщения концентрированного экстракта клубней топинамбура сульфатом аммония (NH₄)₂ SO₄, растворения полученного осадка (в 20 mM K,Na-фосфатном буфере pH 7,0 с 5 mM меркаптоэтанолом), диализа (против 10 объемов 2 mM K,Na-фосфатного буфера pH=7,0 с 5 mM меркаптоэтанолом).

На стадии экстракции инулиназы из клубней топинамбура нами были проведены эксперименты по выявлению наиболее эффективного экстрагента, способствующего максимальному переходу белков в раствор. Одной из основных трудностей выделения растительных белков является полное экстрагирование белков из ткани растений. Поскольку белки находятся внутри отдельных растительных клеток, через оболочки которых они не могут диффундировать в окружающий раствор, то при экстракции белков требуется полное разрушение клеток. Такое разрушение клеток топинамбура мы проводили, используя в качестве гомогенизатора блендер, а в качестве экстрагирующих растворов 9 %-ный раствор хлористого натрия, дистиллированную воду и 0,2 М ацетатный буфер pH 4,6. Один из гомогенатов, где в качестве экстрагента использовалась дистиллированная вода, подвергался дополнительной обработке ультразвуком (Labsonic 2000, B Braun, Германия). Так как в топинамбуре содержание активных полифенолоксидаз (РРО) и их субстратов достаточно велико, то при экстракции белков для подавления РРО активности использовали защитную добавку в виде 5 mM раствора диэтилдитиокарбамата натрия [14].

Таблица 1. Содержание растворенного белка в экстрактах топинамбура

Экстрагирующий раствор	0,2 М ацетатный буфер pH 4,6	9 %-ный раствор хлористого натрия	Дистиллированная вода, ультразвук
Концентрация белка, мг/мл	0,0405	0,262	0,148

Основываясь на полученных результатах, приведенных в табл. 1, можно сделать вывод, что разрушение клеток посредством блендера и экстракция ацетатным буфером малоэффективны для полного извлечения белка из клубней топинамбура.

Дополнительное разрушение клеток посредством ультразвука эффективно даже в случае экстракции обычной дистиллированной водой. Однако наилучшего эффекта разрушения можно достичь в сочетании гомогенизации и плазмолиза клеток, используя в качестве экстрагента высокие концентрации соли, так как максимальное количество растительного глобулярного белка легче выделяется именно в солевой раствор. Таким образом, из трех представленных экстрагирующих растворов наилучшим для использования является 9 %-ный раствор хлористого натрия.

Экстракт из клубней топинамбура представлял собой густой солевой раствор, содержащий малое количество белка и большое количество балластных веществ: фенолов, полисахаридов, пектина, фруктозы и т.д. Концентрирование белкового раствора с применением таких методов, как вакуумное упаривание и осаждение органическими растворителями было неприемлемо вследствие того, что в первом случае балластные вещества концентрировались вместе с белком, а во втором совместно осаждались. Мы посчитали целесообразным применить для очистки и концентрирования белкового раствора метод ультрафильтрации через полые волокна, основываясь на большой разнице молекулярных масс концентрируемых белков и подлежащих удалению балластных составляющих и соли. Дважды в систему вводили по литру дистиллированной воды, что позволило существенно снизить остаточное количество соли и сахаров в концентрате. При концентрировании экстракта его начальный объем уменьшился в 14,5 раз, а содержание белка по сравнению с исходным раствором повысилось во столько же раз, при этом полностью сохранилась его ферментативная активность. Благодаря тому, что в фильтрат ушла основная масса соли и балластных веществ, мы получили возможность провести осаждение белка высаливанием при 90 % насыщения $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Таким образом применение ультрафильтрации позволило не только сконцентрировать растительный белковый раствор с полным сохранением его ферментативной активности, но и добиться значительной степени его очистки от сопутствующих низкомолекулярных примесей.

Следующим этапом работы явилось фракционирование диализата на колонке (25 x 310 мм) с ДЕАЕ-целлюлозой. Фракции были последовательно исследованы на содержание сахаров, белка и инулиназную активность.

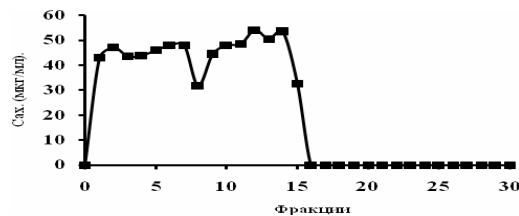


Рис.1. Хроматография диализата – препарата растворимого белка из экстракта клубней топинамбура на ДЕАЕ-целлюлозе. Профиль выхода сахаров.

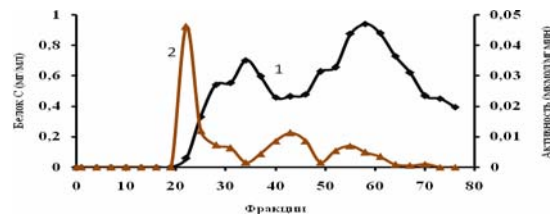


Рис. 2. Хроматография диализата – препарата растворимого белка из экстракта клубней топинамбура на ДЕАЕ-целлюлозе. Профили выхода 1– белка и 2 – изменения инулиназной активности.

На профиле элюции показано влияние ступенчатого возрастания ионной силы раствора элюента на разделение. Как видно из рис. 1, с 1-16 фракцию элюировались все сахара, далее, начиная с 18 фракции, элюировались белки. Исследование фракций на способность к гидролизу инулина показало наличие 3-х последовательных пиков инулиназной активности. В табл. 2 суммированы результаты предварительной очистки инулиназ из клубней топинамбура.

Таблица 2. Результаты предварительной очистки инулиназы из клубней топинамбура

Этапы	Объем, мл	Белок, мг/мл	Удельная активность, Ед/мин	Выход активности, %	Общее сод. редуц. сахаров, мг
Экстракция, фугация, фильтрация	4000	0,262	0,00266	100	323
Концентрирование	275	3,61	0,00273	96.4	9,3
(NH ₄) ₂ SO ₄ (90%), диализ	140	4,7	0,00381	90.17	3,2
Хроматография на ДЕАЕ-целлюлозе.					
I ₁ (18-34)	134	0,357	0,01750		0
I ₂ (35-49)	128	0,910	0,00830		0
I ₃ (50-64)	112	1,076	0,00450		0
				84.44	

Анализ результатов, представленных в табл. 2, показал, что содержание редуцирующих сахаров значительно сокращается (в 35 раз) в результате процесса ультрафильтрации по сравнению с исходным и снижается до нуля после этапа ионообменной хроматографии на ДЕАЕ-целлюлозе. В результате предварительной очистки среднее значение удельной инулиназной активности (среднее арифметическое трех пиков) увеличивается в 3 раза, а общий выход активности фермента составляет 84,44 %.

Результаты нативного электрофореза в 7,7 %-ном полиакриламидном геле образцов объединенных фракций каждого пика с определением инулиназной активности в кусках разрезанного геля показали, что мы имеем три изофермента инулиназы с разной степенью очистки, электрофоретически гетерогенные, гидролизующие инулин с активностью I₁ = 0,0175 Ед/мг, I₂=0,0083 Ед/мг, I₃=0,00450 Ед/мг и отличающиеся друг от друга по электроподвижности (данные не приведены), которые нуждаются в дальнейшей очистке для использования в экспериментах по изучению их физико-химических свойств.

Фракции каждого пика инулиназной активности были объединены, сконцентрированы путем осаждения при 80 %-ном насыщении сульфатом аммония (NH₄)₂SO₄, диализованы и подвергнуты дальнейшей очистке отдельно.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, p. 248-254, 1976.
2. Cazzeta M.L., Martins P.M., Monti R. and Contiero J.Y. (*Polymnia sanchifolia*) extract as a substrate to produce inulinase by *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. Journal of Food Engineering, 66, p. 301-305, 2005.

К.Г. ДЮКОВА, М.С. ИЗМАИЛЯН, Л.С. МАНУКЯН, В.Т. КОЧИКЯН

-
3. Cho Y.J., Yun J.W. Purification and characterization of an endoinulinase from *Xanthomonas oryzae* No. 5. *Process Biochemistry*, 37, p. 1325-1331, 2002.
 4. Edelman J. and Jefford T.G. The metabolism of fructose polymers in plants. 4. B-fructofuranosidases of tubers of *Helianthus tuberosus* L. *Biochem. J.*, 93, p. 148-161, 1964.
 5. Ettalibi M., Baratti J.C. Molecular and kinetic properties of *Aspergillus ficuum* inulinases. *Agric. Biol. Chem.*, 54, p. 61-68, 1990.
 6. Gill P.K., Manhas R.K. and Singh P. Purification and properties of a heat-stable exoinulinase isoform from *Aspergillus fumigatus*. *Bioresource. Technology*, 97, p. 894-902, 2006.
 7. Kushi R.T., Monti R. and Contiero J. Production, purification and characterization of an extracellular inulinase from *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. *Journal of industrial Microbiology and Biotechnology*, Hampshire., 25, p. 63-69, 2000.
 8. Nelson N. A photometric adaptation of the somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, 153, p. 357-380, 1944.
 9. Onodera S., Shiomi N. Purification and substrate specificity of endo-type inulinase from *Penicillium purpurogenum*. *Agr. Biol. Chem.*, 52, p. 2569-2576, 1998.
 10. Rutherford P.P. and Deacon A.C. B-fructofuranosidases from Roots of dandelion (*Taraxacum officinale* Weber). *Biochem. J.*, 126, p. 569-573, 1972.
 11. Singh P. and Gill P.K. Production of Inulinases: recent advances. *Food Technol. Biotechnol.*, 44, (2), p. 151-162, 2006.
 12. Somogyi M. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.*, 195, p. 19-23, 1952.
 13. Warburg O., Christian W. Isolierung und cristallisation des Garungs-ferments endolase. *Biochem. Z.*, 310, p. 384, 1941.
 14. Ziyen E., Pekyardimci S. Characterization of polyphenol oxidase from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*). *Turk. J. Chem.*, 27, p. 217-225, 2003.

Поступила 21.01.2015



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 4(67), 2015

ԱՃԵՑՄԱՆ ՊԱՅՄԱՆՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԾԻՐԱՆԵՆՈՒ ՏՆԿԻՆԵՐԻ ՍՏԱՑՄԱՆ ԱՐԴՅՈՒՆԱԿԵՏՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ ԲԱՑՕԹՅԱ ՀԻԴՐՈՊՈՆԻԿԱՅԻ ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ

Գ.Յ. ՊՈՂՈՍՅԱՆ

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

Ծիրանենու տնկիների հիդրոպոնիկ արտադրություն կազմակերպելու նպատակով բացօթյա հիդրոպոնիկայի պայմաններում ուսումնասիրվել է լցանյութերի (հրաբխային կարմիր խարամ, գլաքար, գլաքար+հրաբխային կարմիր խարամ խառնուրդ (1:1 հարաբերությամբ) և Դավթյանի սննդալուծույթի տարբեր խտությունների (0,25 Ն, 0,5 Ն, 0,75 Ն, 1,0 Ն) ազդեցությունը պատ-վաստակալների և պատվաստված տնկիների աճի և զարգացման վրա: Պարզվել է, որ սերմերի ծլման, պատվաստակալների և պատվաստված տնկիների աճի համար բարենպաստ պայմաններ են ապահովել գլաքարի և հրաբխային կարմիր խարամի 1:1 խառնուրդը և Դավթյանի 0,75 Ն սննդալուծույթը:

Հիդրոպոնիկա – սննդալուծույթ – լցանյութ – ծիրանենի – պատվաստակալ – տնկի

С целью организации гидропонического производства саженцев абрикоса в условиях открытой гидропоники исследовалось влияние наполнителей (красный вулканический шлак, гравий, смесь гравия с красным вулканическим шлаком (1:1 с соотношением) и разных концентраций питательного раствора Давтяна (0,25 N; 0,5 N; 0,75 N; 1,0 N) на рост и развитие подвоев и привитых саженцев.

Установлено, что благоприятные условия для всхожести семян, роста подвоев и привитых саженцев обеспечили смесь гравия с вулканическим шлаком в соотношении 1:1 и питательный раствор Давтяна с концентрацией 0,75 N.

Гидропоника – питательный раствор – наполнитель – абрикос – подвой – саженцы

The influence of substrates (volcanic red slag, gravel, gravel+volcanic red slag mixture (1:1 ratio) and different concentrations of Davtyan's nutrient solution (0.25 N, 0.5 N, 0.75 N, 1.0 N) on growth and development of rootstocks and grafted saplings were studied in open-air hydroponic conditions in order to organize hydroponic production of apricot saplings. It was clarified that the favorable conditions for seed germination and growth of rootstocks and grafted saplings were provided by gravel and volcanic red slag 1:1 mixture, and the best nutrient solution was Davtyan's 0.75 N.

Hydroponics – nutrient solution – substrate – apricot – rootstock – sapling

Պարենի խնդիրը մարդկության առջև ծառացած կարևորագույն խնդիրներից մեկն է, որի լուծման գործում իր ուրույն տեղն ունեն մրգերը՝ այդ թվում ծիրանը, որոնք հանդիսանում են մարդու կենսագործունեության համար անհրաժեշտ վիտամինների, տարբեր օրգանական միացությունների բնական աղբյուր: Վերջին տասնամյակում մեր հանրապետությունում տեղի է ունենում ծիրանենու այգետարածքների նորացման և ավելացման գործընթացներ, որը բերում է բարձրորակ տնկիների արագացված աճեցման պահանջարկ: Այդ գործում մեծ դեր է խաղում բույսերի անհող մշակույթը՝ հիդրոպոնիկան, որը հնարավորություն է տալիս կարճ ժամկետում կազմակերպել որակյալ տնկիների արագացված արտադրություն [1, 2, 6]:

Նյութ և մեթոդ: Ծիրան սովորականը (*Armenica vulgaris* Lam.) պատկանում է վարդազգիների ընտանիքին (*Rosaceae* Juss.): Մինչև 5–8, հազվադեպ՝ 10 մ բարձրությամբ, բույն՝ 30–40 սմ տրամագծով, գորշ-մոխրագույն կեղևով ծառ է: Արարատյան դաշտավայրում, կախված կլիմայական պայմաններից, ծաղկում է մարտի վերջից մինչև ապրիլի կեսերը՝ մինչև տերևների ի հայտ գալը: Պտուղը հասունանում է հունիս–օգոստոս ամիսներին: Աճեցվում է Կովկասում, Միջին Ասիայում, Ուկրաինայում, Ղրիմում, վայրի վիճակում հանդիպում է Կենտրոնական Ասիայում (Տյան–Շանի լեռներում): Բուժական նպատակով օգտագործվում են սերմերը (նրանցից ստացված յուղը *Oleum Armenicae*) պտուղը և բուսախեժը [4, 5, 7]:

Գոյություն ունեն ծիրանենու բազմաթիվ սորտեր, որոնց բազմացման համար որպես պատվաստակալ ծառայում է սովորական ծիրանենին: Այդ սորտերից Արարատյան դաշտավայրում, բարձր արդյունավետության շնորհիվ, մեծ տեղ է զբաղեցնում «Երևանի» (Շալախ) սորտը, որը հանդիպում է ծիրանենի մշակող բոլոր գոտիներում և հանդիսանում է տնկարկների հիմնական սորտը: Ծիրանի տեղական սորտերի մեջ «Երևան»-ին ցրտադիմացկուններից մեկն է: Բժավոր ծակոտկենությամբ վնասվում է համեմատաբար թույլ կերպով [3]:

Ծիրանենու տնկիների հիդրոպոնիկ արտադրության փորձարկումները կազմակերպելու նպատակով սերմերը ցանվել են մարտ ամսվա վերջից – ապրիլի առաջին կեսը: Մինչ ցանքսը սերմերը ստրատիֆիկացվել են 90–110 օր խոնավ ավազի մեջ:

Փորձարկվել են հրաբխային կարմիր խարամ, գլաքար, գլաքար+հրաբխային կարմիր խարամի խառնուրդ (1:1 հարաբերությամբ) լցանյութերը: Ցանքը կատարվել է 2մ² մակերեսով փորձանոթներում՝ 40 սերմ 1մ² սխեմայով: Որպես ստուգիչ փորձերը դրվել են նաև հողային տարբերակում, որտեղ պահպանվել են բոլոր ագրոտեխնիկական միջոցառումները (ռոզում, սնուցում, փխրեցում և այլն):

Հիդրոպոնիկայում բույսերը սնուցվել են Դավթյանի կողմից առաջարկված 0,25 Ն, 0,5 Ն, 0,75 Ն և 1 Ն խտությամբ սննդալուծույթով [1]՝ զարնանը և ամռանը օրական 1–2, իսկ աշնանը՝ մեկ անգամ, որն աստիճանաբար պակասեցնելով հասցվել է տասնօրյակում մեկ անգամի: Բույսերի շիվերի հասունացման և ձմեռման նպատակով սեպտեմբերին սննդարար լուծույթից ամբողջովին հանվել է ազոտը:

Պատվաստմանը նախապատրաստելու նպատակով օգոստոս ամսի սկզբին պատվաստակալի ստորին հատվածի (լցանյութից վերև՝ 25–30 սմ) կողային ճյուղերը էտվել են: Օգոստոս ամսվա երկրորդ կեսից մինչև սեպտեմբեր ամսվա առաջին կեսը կատարվել է աչքապատվաստ: Որպես պատվաստանյութ ընտրվել է «Երևանի» սորտը: Պատվաստված տնկիների մոտ վաղ զարնանը պատվաստի հիմքից 5–ից 10 մմ բարձրության վրա ցողունը հեռացվել է: Հետագա նորմալ աճի և ձևավորման նպատակով պատվաստների ստորին հատվածի (լցանյութից վերև մինչև 30 սմ) կողային ճյուղերը էտվել են: Վեգետացիայի ընթացքում կատարվել են ֆենոլոգիական դիտարկումներ և 15 օրը մեկ կենսամետրիկ չափումներ (պատվաստակալների և պատվաստված տնկիների մոտ՝ բարձրությունը, բնի տրամագիծը, կողային ճյուղերի քանակը, իսկ պատվաստված տնկիների համար նաև պատվաստի հիմքի տրամագիծը): Գիտափորձերը կատարվել են 3 կրկնողությամբ:

Արդյունքներ և քննարկում: Ուսումնասիրությունները ցույց են տվել, որ փորձարկված երեք լցանյութերից սերմերի ծլման, պատվաստակալների (աղ. 1) և պատվաստված տնկիների (աղ. 2) աճի համար բարենպաստ պայմաններ է ապահովել գլաքար + հրաբխային կարմիր խարամը: Սերմերի ծլունակությունը կազմել է 80–90 %, իսկ պատվաստման կաչողունակությունը՝ 80–85 %: Այս տարբերակի պատվաստակալները, պատվաստումից առաջ կատարած չափումների համաձայն, գերազանցել են մյուս հիդրոպոնիկ տարբերակներին. բույսի բարձրությամբ՝ մինչև 1,2; բնի տրամագծով և առաջնային ճյուղերի քանակով՝ մինչև 1,3 անգամ, իսկ հողային տարբերակին՝ բույսի բարձրությամբ՝ մոտ 1,3; բնի տրամագծով՝ մոտ 1,2 և առաջնային ճյուղերի քանակով՝ 1,5 անգամ: Վեգետացիայի վերջում կատարված չափումների համաձայն առավելությունը մյուս հիդրոպոնիկ տարբերակների նկատմամբ եղել է. բույսի բարձրությամբ և առաջնային ճյուղերի քանակով՝ մինչև 1,2; բնի տրամագծով՝ մինչև 1,1 անգամ, իսկ հողայինի նկատմամբ. բույսի բարձրությամբ՝ մինչև 1,5; բնի տրամագծով՝ մինչև 1,2 և առաջնային ճյուղերի քանակով՝ մինչև 1,9 անգամ (աղ. 1):

Պատվաստված տնկիների դեպքում գլաքարի և հրաբխային կարմիր խարամի խառնուրդում աճեցված բույսերը (նկ. 1) ծառաչափական տվյալներով գերազանցել են մյուս հիդրոպոնիկ տարբերակներին. բույսի բարձրությամբ և առաջնային ճյուղերի քանակով՝ մինչև 1,2; բնի տրամագծով և պատվաստի հիմքի տրամագծով՝ մինչև 1,5, իսկ հողայինին՝ բույսի բարձրությամբ՝ 1,8; բնի տրամագծով և պատվաստի հիմքի տրամագծով՝ 2,1 և առաջնային ճյուղերի քանակով՝ 2,4 անգամ (աղ. 2):

Սննդալուծույթի խտության ազդեցության հետազոտությունների արդյունքները ցույց են տվել, որ ծիրանենու պատվաստակալների աճի և զարգացման համար լավագույն պայմաններ են ապահովել 0,75 Ն և 1,0 Ն սննդալուծույթների կիրառումը (աղ. 3, նկ. 2):

Աղյուսակ 1. Ծիրանենու պատվաստակալների ծառաչափական տվյալները տարբեր լցանյութերում

Լցանյութ	Բարձրություն, սմ			Բնի տրամագիծ, մմ			Առաջնային ճյուղեր, հատ		
	պատվաստումից առաջ	վեգետացիայի վերջում	աճող պատվաստումից հետո	պատվաստումից առաջ	վեգետացիայի վերջում	աճող պատվաստումից հետո	պատվաստումից առաջ	վեգետացիայի վերջում	աճող պատվաստումից հետո
հրաբխային խարամ + գլաքար	109	131	22	10	11	1	18	27	9
հրաբխային խարամ	101	120	19	9	10	1	18	25	7
գլաքար	92	112	20	8	10	2	14	22	8
հող /ստուգիչ/	81	85	4	8	9	1	12	14	2

Աղյուսակ 2. Ծիրանենու պատվաստված տնկիների ծառաչափական տվյալները տարբեր լցանյութերում

Լցանյութ	Բարձրությունը, սմ	Բնի տրամագիծը, մմ	Պատվաստի հիմքի տրամագիծը, մմ	Առաջնային ճյուղերը, հատ
հրաբխային խարամ + գլաքար	124	25	17	12
հրաբխային խարամ	105	20	14	10
գլաքար	101	17	11	10
հող /ստուգիչ/	68	12	8	5



Նկ.1. Հրաբխային կարմիր խարամ + գլաքար լցանյութում աճեցված ծիրանենու պատվաստված տնկիները



Նկ.2. Ծիրանենու պատվաստակալները պատվաստումից առաջ սննդա լուծույթի տարբեր խտության պայմաններում

Այս խտություններով սնուցված պատվաստակալները գերազանցել են մյուս հիդրոպոնիկ տարբերակներին (0,25 և 0,5 և). բույսի բարձրությամբ՝ 1,4 – 1,8, բնի տրամագծով՝ 1,4 – 1,7 և առաջնային ճյուղերի քանակով՝ 1,6 – 2,7 անգամ: Հողային պատվաստակալների նկատմամբ այս ցուցանիշները կազմել են. 1,5; 1,4 – 1,6 և 1,3 – 1,9 անգամ, համապատասխանաբար:

Չնայած նրան, որ ծառաչափական տվյալներով 1,0 և 0,75 և խտություններով սնուցված պատվաստակալները իրարից գրեթե չեն տարբերվում, սակայն նպատակահարմար է ու տնտեսապես ձեռնատու կիրառել 0,75 և խտությունը, քանի որ այս տարբերակում աճեցված բոլոր պատվաստակալները ևս, պատվաստման ընթացքի չափումների համաձայն, պատրաստ են պատվաստման:

Հետազոտությունները ցույց են տվել, որ ծիրանենու պատվաստված տնկիների աճի և զարգացման համար լավագույն պայմաններ են ապահովել 0,75 և 1,0 և սննդալուծույթների կիրառումը (աղ. 4): 0,75 և խտությամբ սննդալուծույթով սնուցված տնկիների առավելությունը մյուս տարբերակների նկատմամբ հետևյալն է. բույսի բարձրությամբ և բնի տրամագծով մինչև 1,3, պատվաստի հիմքի տրամագծով՝ մինչև 1,4

և առաջնային ճյուղերի քանակով մինչև 2,7 անգամ: Հողային տարբերակում աճեցված բույսերի հետ համեմատած 0,75 Ն լուծույթով սնուցված բույսերի աճը գերազանցել է. բույսի բարձրությամբ՝ 1,6, բնի և պատվաստի հիմքի տրամագծերով՝ 2,1 և առաջնային ճյուղերի քանակով 3,2 անգամ:

Աղյուսակ 3. Ծիրանենու պատվաստակալների ծառաչափական տվյալները տարբեր խտության սննդալուծույթներում

Սննդալուծույթի խտություն, Ն	Բարձրությունը, սմ	Բնի տրամագիծը, մմ	Առաջնային ճյուղերի քանակը, հատ
1,0	131	14	27
0,75	128	13	18
0,5	93	9	10
0,25	71	8	11
հող /ստուգիչ/	85	9	14

Ծիրանենու տնկիների հիդրոպոնիկ պայմաններում աճեցման փորձերի արդյունքներից պարզվել է նաև, որ 1 մ² հիդրոպոնիկ մակերեսից երկու տարում հնարավոր է ստանալ 20 – 22 որակյալ տնկիներ, որոնք հիմնական այգետարածքներում վերատնկման ժամանակ ապահովում են 95-98% կաշոդակաճություն:

Աղյուսակ 4. Ծիրանենու պատվաստված տնկիների ծառաչափական տվյալները տարբեր խտության սննդալուծույթներում

Սննդալուծույթի խտություն, Ն	Բարձրությունը, սմ	Բնի տրամագիծը, մմ	Պատվաստի հիմքի տրամագիծը, մմ	Առաջնային ճյուղերի քանակը, հատ
1,0	112	24	16	14
0,75	128	25	17	16
0,5	104	21	14	12
0,25	98	19	12	6
հող /ստուգիչ/	68	12	8	5

Ամփոփելով կատարված ուսումնասիրությունները, կարելի է նշել, որ ծիրանենու հիդրոպոնիկ տնկիների աճեցման համար նպատակահարմար է պատվաստակալները և պատվաստված տնկիները սնուցել Դավթյանի 0,75 սննդալուծույթով՝ կիրառելով գլաքարի և հրաբխային կարմիր խարամի (1:1 հարաբերությամբ) խառնուրդ լցանյութը:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. Դավթյան Գ.Ս., Մայրապետյան Ս.Խ. Վարդաբույր խորդենու անհող արտադրությունը. Երևան, ՀՍՄՀ ԳԱ հրատարակչություն, էջ 15-21, 1976:
2. Հովսեփյան Ա.Հ., Էրոյան Ս.Ա., Մայրապետյան Խ.Ս., Պողոսյան Գ.Յ. Մի շարք ծառափառեսակների տնկիների արտադրությունը անհող մշակությամբ. «Էկոլոգիայի բնության պահպանության կարևորությունը կայուն զարգացման հեռանկարում» Միջազգային գիտաժողովի նյութեր, Երևան, էջ 63, 2008:
3. Վերմիշյան Ա.Ս., Դիլանյան Հ.Խ., Սանադյան Ս.Բ. Հայաստանի պտուղները, Երևան, 1, էջ 27-30, 43-45, 1958:
4. Есаян Г.С., Культура абрикоса в Армении. Ереван, “Айастан”с.14-16, 1977.
5. Лавренов В.К., Лавренов Г.В., Овипко В.Д, Лавренов Ю.В., Романков В.А. Энциклопедия пищевых лекарственных растений. М., изд-во АСТ, с. 16-18, 2001
6. Майрапетян С.Х. Культура эфиромасличных растений в условиях открытой гидропоники. Ереван: Издательство АН Арм. ССР, 314 с, 1989.
7. Фетисов Г.Г. Плодоводство и ягодоводство. М., с. 128-130, 1953.

Ստացվել է 04.03.2015



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

Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 4(67), 2015

**ՊՂՊԵՂԱՅԻՆ ԴԱՂՁԻ ԵԹԵՐԱՑՈՒՂԻ ՔԱՆԱԿԱԿԱՆ ԵՎ ՈՐԱԿԱԿԱՆ
ՑՈՒՑԱՆԻՇՆԵՐԻ ՀԱՄԵՄԱՏԱԿԱՆ ԲՆՈՒԹԱԳԻՐԸ ԱՃԵՑՄԱՆ ՏԱՐԲԵՐ
ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ**

**Ս.Խ. ՄԱՅՐԱՊԵՏՅԱՆ, Զ.Ս. ԱԼԵՔՍԱՆՅԱՆ, Մ.Խ. ԴԱՐՅԱՂԱՐ,
Ա.Ա. ԹՈՎՄԱՍՅԱՆ, Բ.Թ. ՍՏԵՓԱՆՅԱՆ**

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

Հիդրոպոնիկական տարբեր եղանակների (գլանային, ակոսային, համատարած և դասական) կիրառմամբ աճեցված պղպեղային դաղձի (*Mentha piperita* L.) բուսահումքը չոր քաշով հիմնականում գերազանցում է հողային մշակույթին 1.5-2.7 անգամ: Փորձարկված բոլոր տարբերակներում էթերայուղի սինթեզը առավել ինտենսիվ է ընթացել 3-րդ հարի ժամանակ, իսկ առավելագույն էլ (1.6-2.6 անգամ) ապահովել են գլանային և դասական հիդրոպոնիկական համակարգերը: Եթերայուղի որակական ցուցանիշների համեմատությունից երևում է, որ կարևորագույն բաղադրիչ մենթոլ սպիրտի բարձր պարունակություն (71-73%) դիտվել է գլանային, դասական և հողային մշակույթի պայմաններում: Մինչդեռ, իզոմենթոնի բարձր պարունակությամբ (11-15%) աչքի են ընկել ակոսային և համատարած տարբերակները: Գլանային հիդրոպոնիկական համակարգում, վեգետացիոն շրջանի ընթացքում, մենթոլի առավելագույն պարունակություն գրանցվել է սեպտեմբեր ամսին (71%), իսկ ամենացածրը՝ օգոստոս ամսին (40%):

*Ջրաշիթային հիդրոպոնիկա – պղպեղային դաղձ – էթերայուղ –
մենթոլ – արդյունավետություն*

Лекарственное сырье мяты перечной, выращенной в разных гидропонических системах (цилиндрическая, бороздовая, сплошная и классическая) по сухому весу превосходит почвенную культуру примерно в 1.5-2.7 раз. Во всех испытанных вариантах наиболее интенсивный синтез эфирного масла наблюдался при 3-м укосе, а наивысший выход эфирного масла в 1.6-2.6 раза обеспечили цилиндрическая и классическая гидропонические системы. При сравнении качественных показателей эфирного масла установлено, что высокое содержание важнейшего компонента – спирта ментола (71-73%) наблюдалось в условиях цилиндрической и классической гидропоники, а также почвы. Однако высоким содержанием изоментона (11-15%) выделялись бороздовая и сплошная гидропонические варианты. В условиях цилиндрической гидропоники в период вегетации высокое содержание ментола (71%) отмечалось в сентябре, а наименьшее (40%) – в августе.

Струйная гидропоника – мята перечная – эфирное масло – ментол – продуктивность

Peppermint (*Mentha piperita* L.) planting material, obtained with the application of different hydroponics methods (cylindrical, gully, continuous and classical), mostly exceeds the soil culture with dry weight 1.5-2.7 times. Essential oil synthesis was more intensive during the third cut in all the tested variants, and maximum output (1.6-2.6 times) was provided by cylindrical and classical hydroponics systems. We can see from comparison of qualitative indices that high content (71-73%) of essential component menthol was observed in cylindrical, classical and soil culture conditions. However, gully and continuous variants had a high content (11-15%) of izomenthon. During the vegetation period, maximum amount of menthol was registered in September (71%), and minimum amount in August (40%) in cylindrical hydroponics system.

Water-stream hydroponics – peppermint – essential oil – menthol – productivity

Հիդրոպոնիկան իրենից ներկայացնում է բույսերի անհող արտադրության կենսատեխնոլոգիա, որը գործում է կառավարվող մշակության պայմաններում, արհեստականորեն ստեղծված միջավայրում, սակայն այն չի հակազդում ինտենսիվ գյուղատնտեսության սովորական մեթոդներին, այլ հանդիսանում է մարդկային աշխատուժի առավել արդյունավետ օգտագործման նոր, լրացուցիչ բնագավառ, կենսաբանական արդյունաբերության մի ճյուղ [1, 14]:

ՀՀ ԳԱԱ Հիդրոպոնիկայի պրոբլեմների ինստիտուտում իրականացվող հետազոտություններում կարևորում են հիդրոպոնիկ նոր համակարգերի մշակման աշխատանքները: Դրանցից ամենահեռանկարայինը շուրջ 25 տարվա հետազոտությունների արդյունքում մշակված պոլիմերային թաղանթի օգտագործմամբ «ջրաշիթային հիդրոպոնիկական համակարգն» է, իր չորս տարատեսակներով՝ համատարած, գլանային, ակոսային և բազմամյա տնկարկային [2-5, 14]:

Այս առումով, առաջին անգամ նորագույն «ջրաշիթային հիդրոպոնիկայի» փորձնական մոդուլներում (գլանային, ակոսային, համատարած) կատարվել են դասական հիդրոպոնիկայի և հողային մշակույթի հետ համեմատական հետազոտություններ արժեքավոր եթերայուղատու և դեղատու մշակաբույս պղպեղային դադձի արդյունավետության, ինչպես նաև բուսահումքում եթերայուղի քանակական և որակական առանձնահատկությունների ուսումնասիրման ուղղությամբ:

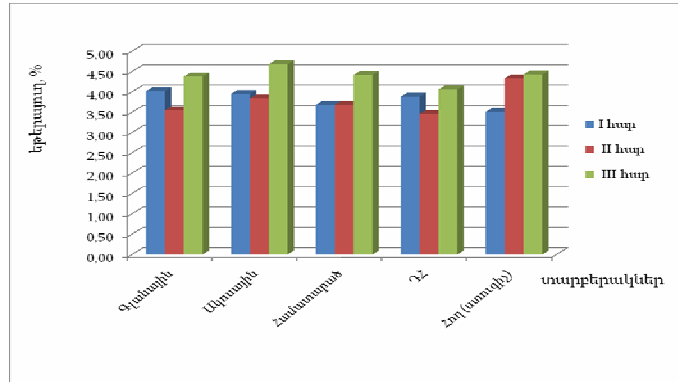
Նյութ և մեթոդ: Ուսումնասիրությունները կատարվել են 2012-2014թթ. Արարատյան դաշտի պայմաններում, որն աչքի է ընկնում արտահայտված չոր կլիմայով, կիսաանապատային ջերմության և խոնավության մեծ տատանումներով: Գիտափորձերում որպես տնկանյութ օգտագործվել են հիդրոպոնիկ եղանակով ստացված տնկիկները: Ջրաշիթային հիդրոպոնիկայի պայմաններում բույսերը դրվել են 8 մ² սնման մակերես ունեցող գլանային, ակոսային, համատարած համակարգերում և հիդրոպոնիկական փորձնական կայանի 5 մ² մակերեսով կիսաարտադրական լաստակներում՝ 8 բույս/մ² խտությամբ: Հիդրոպոնիկական բոլոր համակարգերում որպես լցանյութ օգտագործվել են 3-15 մմ մասնիկների տրամագծով հրաբխային խարամ: Բույսերի սնուցումը կատարվել է Գ.Ս.Դավթյանի սննդալուծույթով [7], վեգետացիայի սկզբում 0.5 Ն, ապա մեկ ամիս անց, ողջ վեգետացիայի ընթացքում 0.75 Ն խտությամբ: Կախված եղանակային պայմաններից, ջրաշիթային հիդրոպոնիկայում, օրվա ընթացքում պարբերաբար սննդալուծույթը շիթի ձևով անվերադարձ (շուրջ 6-20 անգամ և 10-15 վ տևողությամբ) մղվել է յուրաքանչյուր բույսի արմատաբնակ շերտ: Մեկանգամյա տրվող լուծույթի չափը զարնանը կազմել է 20-30, ամռանը և աշնանը՝ 30-50 մլ: Դասական հիդրոպոնիկայում (ԴՀ) բույսերը սնուցվել են 1-3 անգամ, հողային մշակույթում (4 մ²)՝ 3-4 օրը 1 անգամ, որտեղ պահպանվել են բոլոր ընդունված ագրոտեխնիկական պայմանները (քաղհան, փխրեցում, պարարտացում և այլն): Չոր դեղահումքում եթերայուղի պարունակությունը որոշվել է ըստ ՊԴ XI-ի [6], իսկ եթերայուղի որակական վերլուծությունները կատարվել են Bruker Daltonik ֆիրմայի EM 640S մակնիշի ժամանակակից գազ-քրոմատ-մասս-սպեկտրոմետրի (ԳՔ-ՄՍ) օգնությամբ՝ «HP-5MS» մեթոդով: Եթերայուղի բաղադրչների նույնականությունը որոշվել է ինչպես NIST-MS համակարգչի գրադարանային տվյալների, այնպես էլ համեմատական նմուշների օգնությամբ: Փորձերը դրվել են 4-8 կրկնողությամբ, մաթեմատիկական մշակումը կատարվել է ըստ Դոսպեխովի [8]:

Արդյունքներ և քննարկում: Հիդրոպոնիկական տարբեր եղանակների կիրառմամբ ստացված պղպեղային դադձի բուսահումքը, բացառությամբ համատարածի, չոր քաշով 1.5-2.7 անգամ գերազանցում է հողային մշակույթին (աղ.1): Միաժամանակ, պարզվել է գլանային հիդրոպոնիկական համակարգի առավելությունը (1.8-2.2 անգամ) ակոսային և համատարած համակարգերի համեմատությամբ: Անկախ մշակման պայմաններից, 3-րդ հարի ժամանակ ապահովվել է ընդհանուր բերքի շուրջ 37-47%-ը (աղ. 1):

Աղյուսակ 1. Պղպեղային դադձի բերքավետությունը ըստ հարերի

Տարբերակ	Դեղահումքի չոր քաշը, գ/բույս			
	Ընդհանուր	I հար (հուլիս)	II հար (օգոստոս)	III հար (սեպտեմբեր)
Գլանային	155.1	45.7	43.9	65.5
Ակոսային	83.7	25.6	24.7	33.4
Համատարած	69.7	13.1	23.7	32.9
ԴՀ	149.0	53.1	40.7	55.1
Հող (ստուգիչ)	57.0	16.8	14.7	25.5
ՍԵՏ ₀₅	15.3			

Դաղձի չոր դեղահումքում փորձարկված բոլոր տարբերակներում եթերայուղի պարունակությունը առավել բարձր է ընթացել 3-րդ հարի ժամանակ (նկ. 1):



Նկ.1. Պղպեղային դաղձի եթերայուղի պարունակությունը ըստ հարերի

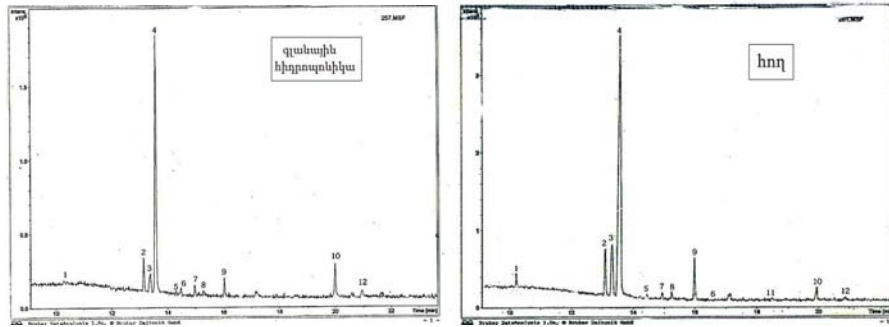
Պետք է նշել, որ դաղձի բարձր արդյունավետության շնորհիվ, մեկ բույսի հաշվով եթերայուղի առավելագույն ել (1.6-2.6 անգամ) վեգետացիայի ընթացքում ապահովել են գլանային և դասական հիդրոպոնիկական համակարգերը (աղ. 2):

Աղյուսակ 2. Պղպեղային դաղձի դեղաքիմիական ցուցանիշները (բերվում են 3 հարերի միջին տվյալները)

Տարբերակ	Եթերայուղի պարունակությունը (ըստ ՊՊ XI-ի 1%-ից ոչ պակաս)		Խոնավություն (ըստ ՊՊ XI-ի 14%-ից ոչ ավել)	Ընդհանուր մոխիր (ըստ ՊՊ XI-ի 14%-ից ոչ ավել)	10% HCl -ում չլուծվող մոխիր (ըստ ՊՊ XI-ի 6%-ից ոչ ավել)
	%	եղ, գ/բույս	%	%	%
Գլանային	4.0	6.2	9.7	12.8	1.1
Ակոսային	4.2	3.5	10.0	13.2	1.3
Համատարած	3.9	2.7	9.7	13.7	1.2
ԴՅ	3.8	5.7	9.3	14.2	1.1
Հող (ստուգիչ)	4.1	2.3	10.6	14.8	2.5

Եթերայուղատու բույսերում աճման և զարգացման ընթացքում եթերայուղը ենթարկվում է ոչ միայն քանակական, այլ նաև որակական փոփոխությունների [10, 13]: Ըստ զրականության տվյալների, պղպեղային դաղձի եթերայուղի քիմիական կազմությունը բավականին բարդ է, այն պարունակում է շուրջ 30 տերպենային միացություններ: Հիմնական բաղադրամասերը, որոնցով որոշվում է եթերայուղի որակը, հանդիսանում են մենթոլը, մենթոնը, իզոմենթոնը [12]: Տերպենից և ծաղկաբույլերից ստացված եթերայուղը, մենթոլի բարձր պարունակության շնորհիվ, լայնորեն կիրառվում է սրտանոթային, շնչառական ուղիների, երիկամների, միզոցների և այլ հիվանդությունների բուժման ժամանակ, իսկ տերպենները՝ աղեստամոքսային հիվանդությունների դեպքում՝ որպես հանգստացնող, հակաբորբոքային և արյան ճնշումը իջեցնող միջոց: Օգտագործվում է նաև օծանելիքի և սննդի արտադրություններում [9-11]:

Առաջին անգամ ջրաշիթային, դասական հիդրոպոնիկայի և հողային մշակույթի պայմաններում կատարված հետազոտություններից ստացված արդյունքները ցույց են տվել (նկ. 2, աղ. 3), որ փորձարկված տարբերակներում եթերայուղի որակական ցուցանիշները զգալիորեն տարբերվում են: Ընդհանուր առմամբ, մենթոլի բարձր պարունակություն (71-73 %) դիտվել է գլանային, դասական և հողային մշակույթի պայմաններում. համատարած և ակոսային հիդրոպոնիկայի համեմատությամբ միջին հաշվով ավելանում է 1.1-1.4 անգամ: Մինչդեռ, իզոմենթոնի բարձր պարունակությամբ (11-15 %) աչքի են ընկել ակոսային և համատարած տարբերակները:



Նկ.2. Տարբեր պայմաններում աճեցված պղպեղային դաղձի եթերայուղի ԳԲ-ՄՍ-ը (նկ.2-ում նշված թվերը համապատասխանում են աղ. 3-ում տրված բաղադրամասերի համարներին)

Աղյուսակ 3. Պղպեղային դաղձի եթերայուղի քիմիական բնութագիրը հիդրոպոնիկայի և հողային մշակույթի պայմաններում

N	Եթերայուղի հիմնական բաղադրամասերը	Զանալին		Ակոսային		Համատարած		Դասական		Հող	
		գրանցման ժամանակը, րոպե	պարունակությունը, %	գրանցման ժամանակը, րոպե	պարունակությունը, %	գրանցման ժամանակը, րոպե	պարունակությունը, %	գրանցման ժամանակը, րոպե	պարունակությունը, %	գրանցման ժամանակը, րոպե	պարունակությունը, %
1	Դ-Լիմոնեն	10.27	0.86	10.59	3.10	10.72	0.32	10.27	2.17	10.21	1.74
2	Իզոմենթոն	13.13	7.30	13.68	11.2	13.74	14.77	13.43	9.21	13.09	6.76
3	Մենթոֆուրան	13.34	2.50	13.90	8.22	13.95	0.16	13.39	11.80	13.30	7.15
4	Սենթոլ	13.58	71.43	14.29	65.6	14.23	50.92	8.56	72.16	13.58	73.36
5	Ցեմիլալ	14.47	1.08	15.10	0.50	15.15	0.19	14.35	0.06	14.43	0.51
6	Վալերիանաթթու	---	---	15.41	0.19	15.46	0.23	14.88	0.45	16.64	0.24
7	Պուլեգոն	14.96	2.06	15.64	1.88	15.68	6.71	15.07	2.59	14.93	0.62
8	Պիպերիդոն	15.28	1.15	15.97	1.16	16.00	0.93	15.40	3.82	15.24	1.04
9	Մենթիլ ացետատ	16.02	3.32	16.74	4.43	16.76	1.45	16.18	20.54	15.98	5.55
10	Մինթ ֆուրանոն	17.18	8.05	21.04	2.74	21.06	17.07	17.40	10.04	17.14	2.14
11	Կարիոֆիլեն	---	---	19.47	0.38	19.82	0.20	18.80	1.33	18.50	0.20
12	1-Ցիկլոկտեն-1-կարբոնաթթու	20.95	2.24	20.96	0.60	22.07	7.0	21.38	3.50	20.86	0.57

Աղյուսակ 4. Պղպեղային դաղձի եթերայուղի քիմիական բնութագիրը ըստ հարերի (զանալին հիդրոպոնիկա)

N	Եթերայուղի հիմնական բաղադրամասերը	I հար		II հար		III հար	
		գրանցման ժամանակը, րոպե	պարունակությունը, %	գրանցման ժամանակը, րոպե	պարունակությունը, %	գրանցման ժամանակը, րոպե	պարունակությունը, %
1	Դ-Լիմոնեն	10.19	0.70	10.26	3.34	10.27	0.86
2	Իզոմենթոն	13.09	12.02	13.42	6.42	13.13	7.30
3	Մենթոֆուրան	13.28	0.55	13.37	13.26	13.34	2.50
4	Սենթոլ	13.57	54.61	13.72	40.03	13.58	71.43
5	Ցեմիլալ	14.42	0.33	14.47	0.52	14.47	1.08
6	Վալերիանաթթու	14.77	0.22	14.86	0.47	---	---
7	Պուլեգոն	14.96	32.08	15.07	29.0	14.96	2.06
8	Պիպերիդոն	15.23	1.09	15.30	1.43	15.28	1.15
9	Մենթիլ ացետատ	15.97	0.57	16.02	0.88	16.02	3.32
10	Մինթ ֆուրանոն	19.94	3.80	19.99	2.98	17.18	8.05
11	Կարիոֆիլեն	18.50	0.30	18.54	0.76	---	---
12	1-Ցիկլոկտեն-1-կարբոնաթթու	20.91	1.74	20.94	0.93	20.95	2.24

Վեգետացիոն շրջանի յուրաքանչյուր հատվածում եթերայուղը ունենում է քիմիական որոշակի կազմ [1], ուստի քննարկվող հարցը կարևոր նշանակություն ունի բերքահավաքի օպտիմալ ժամկետի ճիշտ որոշման համար, ինչը հնարավորություն կտա համապատասխան ժամկետում կատարված բերքահավաքի միջոցով ունենալ այս կամ այն արժեքավոր բաղադրիչի ավելի մեծ պարունակությամբ եթերայուղ:

Կատարված հետազոտությունների արդյունքում պարզվել է (աղ. 4), որ գլանային հիդրոպոնիկայի համակարգում¹ մենթոլի առավելագույն պարունակություն դիտվել է սեպտեմբեր ամսին (71.4 %), իսկ ամենացածր պարունակություն՝ օգոստոս ամսին (40.0 %): Բավականին հետաքրքրական է գլանային հիդրոպոնիկայի պայմաններում դաղձի եթերայուղի առավելագույն (I և III հար) և նվազագույն (II հար) պարունակությունների ընդհանուր քանակական և որակական համեմատությունը. նշված ժամանակահատվածներում եթերայուղի պարունակության նվազմանը (3.6 %) ուղեկցել է եթերայուղի հիմնական բաղադրիչների՝ մենթոլի (40.0 %), իզոմենթոնի (6.4 %), մինթ ֆուրանոնի (3.0 %) նվազում և Դ-լիմոնենի (3.3 %), մենթոֆուրանի (13.3 %), պիպերիդոնի (1.4 %) ավելացումը:

Եթերայուղի որակական ուսումնասիրությունները ցույց են տվել, որ որպես կանոն վեգետացիայի երկրորդ հարում /օգոստոս/ առավել ինտենսիվ է ընթացել Դ-լիմոնենի, մենթոֆուրանի կենսասինթեզը: Մինչդեռ, պուլվերի դեպքում, սեպտեմբերին վեգետացիայի վերջում, նկատվել է դրա պարունակության կտրուկ անկում՝ 14-16 անգամ (32.1-2.06 %):

Այսպիսով, հիդրոպոնիկական տարբեր եղանակների կիրառմամբ ստացված պղպեղային դաղձի բուսահումքը չոր քաշով, հիմնականում, գերազանցում է հողային մշակույթին 1.5-2.7 անգամ: Եթերայուղի սինթեզը առավել ինտենսիվ է ընթացել 3-րդ հարի ժամանակ, իսկ առավելագույն էլ (1.6-2.6 անգամ) վեգետացիայի ընթացքում ապահովել են գլանային և դասական հիդրոպոնիկական համակարգերը:

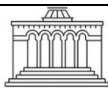
Եթերայուղում մենթոլի բարձր պարունակություն (71-73 %) դիտվել է գլանային, դասական և հողային մշակույթի պայմաններում: Մինչդեռ, իզոմենթոնի (որը, ի դեպ, վատացնում է եթերայուղի որակը) բարձր պարունակությամբ (11-15 %) աչքի են ընկել ակոսային և համատարած տարբերակները: Մենթոլի առավելագույն պարունակություն գլանային հիդրոպոնիկական համակարգում դիտվել է սեպտեմբեր ամսին (71 %), իսկ ցածր պարունակությունը՝ օգոստոս ամսին (40 %):

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. *Դավթյան Գ.Ս., Մայրապետյան Ս.Ս.* Վարդաբույր խորդենու անհող արտադրությունը. Երևան, ՀՄՄՀ ԳԱ հրատարակչություն, էջ 15-21, 1976:
2. *Մայրապետյան Ս.Ս., Թադևոսյան Ա.Հ., Հովսեփյան Ա.Հ., Մայրապետյան Ս.Ս.* «Բույսերի անհող աճեցման եղանակ և դրա իրականացման համակարգ», ՀՀ գյուտի արտոնագիր, թիվ 1849 A2, 2006:
3. *Մայրապետյան Ս.Ս., Թադևոսյան Ա.Հ., Հովսեփյան Ա.Հ., Մայրապետյան Ս.Ս.* «Տնկարկվող բույսերի անհող աճեցման եղանակ և դրա իրականացման համակարգ», ՀՀ գյուտի արտոնագիր, թիվ 1946 A2, 2007(ա):
4. *Մայրապետյան Ս.Ս., Թադևոսյան Ա.Հ., Հովսեփյան Ա.Հ., Մայրապետյան Ս.Ս.* «Ցանովի խոտաբույսերի անհող աճեցման եղանակ և դրա իրականացման համակարգ», ՀՀ գյուտի արտոնագիր, թիվ 1988 A2, 2007 (բ):
5. *Մայրապետյան Ս.Ս., Թադևոսյան Ա.Հ., Հովսեփյան Ա.Հ., Մայրապետյան Ս.Ս.* «Խոտաբույսերի անհող աճեցման եղանակ և դրա իրականացման համակարգ», ՀՀ գյուտի արտոնագիր, թիվ 1989 A2, 2007 (գ):
6. Государственная фармакопея СССР, XI изд., выпуск 2. М., Медицина, 1990, www.fito.nnov.ru/pharmasoraеa.
7. *Давтян Г.С.* Гидропоника. В кн.: Справочная книга по химизации сельского хозяйства. М., Колос, 1980, с. 382-385.
8. *Доспехов Б.А.* Методика полевого опыта, М. 1985, 351 с., с. 223-228.
9. *Лебеда А.Ф., Джуренко Н.И., Исаякина А.П., Собко В.Г.* Лекарственные растения. Самая полная энциклопедия. АСТ-ПРЕСС КНИГА, М., с79-80, 2006.
10. *Майрапетян С.Х.* Культура эфиромасличных растений в условиях открытой гидропонии. Изд. АН Арм. ССР, Ереван, 313с., 1989.
11. Мята перечная (*Mentha piperita* L.), биологические особенности, выращивание, применение в медицине, в косметике и в кулинарии. 2010. <http://www.floraprice.ru/articles/apteka/podarok-skazachnoj-nimfy.html>
12. Физико-химические показатели масла мяты различного происхождения. <http://www.vesex.ru/pdf/mentha.pdf> :
13. *Gerhard Buchbauer.* Handbook of essential oils science, technology, and applications. 994 p., 2010.
14. *Mairapetyan S.Kh., Daryadar M.Kh., Alexanyan J.S., Tadevosyan A.H., Tovmasyan A.H., Stepanyan B.T., Galstyan H.M.* Comparative description of productivity and content of biologically active substances of some essential oil-bearing plants in conditions of new water stream hydroponics. Biolog. Jour. of Armenia, 65, 3, 80-84, 2013.

Ստացվել է 08.05.2015

¹ Փորձարկված տարբերակներից պղպեղային դաղձի բուսահումքի, նրանում երկրորդային ծագում ունեցող կարևորագույն միացություն՝ եթերայուղի առավելագույն էլ է ապահովում գլանային հիդրոպոնիկական համակարգը:



Биол. журн. Армении, 4 (67), 2015

ОРНИТИНКАРБАМОИЛТРАНСФЕРАЗНАЯ И АРГИНАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ОРГАНОВ КРЫС В УСЛОВИЯХ ДВУСТОРОННЕЙ ИНТРАЦЕРЕБРО-ВЕНТРИКУЛЯРНОЙ ИНЪЕКЦИИ АМИЛОИДНОГО ПЕПТИДА A β (25-35)

А.А. НИКОЯН, Л.Р. ТУМАНЯН

Ереванский госуниверситет, кафедра биохимии
bio_chm@ysu.am

В мозгу крыс, интоксифицированных амилоидным пептидом A β (25-35), на фоне нарушения орнитинкарбамоилтрансферазы (ключевого фермента, отсутствующего в мозгу орнитинового цикла мочевинообразования) наблюдается двукратное увеличение аргиназной активности, что может быть связано с появлением уреотелической, т.е. участвующей в цикле мочевинообразования формой фермента. Отсутствие в мозгу животных, получавших после интоксикации паратгормон, активности орнитинкарбамоилтрансферазы и падение аргиназной активности до уровня контроля может быть связано с участием паратгормона в стабилизации клеточного Ca²⁺-гомеостаза, способствующей предотвращению развития болезни Альцгеймера.

Болезнь Альцгеймера – орнитинкарбамоилтрансфераза – аргиназа – паратгормон

A β (25-35) ամփոփողային պեպտիդով խիտահարված առնետների ուղեղում հայտնաբերվում է առողջ կենդանու ուղեղում բացակայող միզանյութի գոյացման օրնիտինային ցիկլի առանցքային ֆերմենտը՝ օրնիտինկարբամոլիտրանսֆերազը: Ձուգահեռ տեղի է ունենում արգինազային ակտիվության գրեթե կրկնակի բարձրացում, որը, հնարավոր է, պայմանավորված է ֆերմենտի ուրեոթելիկ, այսինքն միզանյութի գոյացման ցիկլում մասնակցող ձևի ի հայտ գալով: Ախտահարումից հետո պարատհորմոն ստացած կենդանիների ուղեղում օրնիտինկարբամոլիտրանսֆերազի բացակայությունը, ինչպես նաև արգինազի ակտիվության անկումը, ստուգիչի մակարդակի կարող է կապված լինել բջջային Ca²⁺-հոմեոստազի կարգավորման հետ, որն էլ հնարավոր է կանխի Ալցհայմերի հիվանդության զարգացումը:

Ալցհայմերի հիվանդություն – օրնիտինկարբամոլիտրանսֆերազ – արգինազ – պարատհորմոն

The key enzyme of urea formation in ornithine cycle, otherwise missing in the brain of healthy rats, was observed in the brains of rats intoxicated with amyloid peptide A β (25-35). Parallel to this approximately a doubled increase of arginase activity was taking place, which possibly was conditioned by the emergence of the ureotelic form participating in urea cycle. The treatment of intoxicated rats with parathormone results the absence of ornithinecarbamoyltransferase in their brains as well as the decrease of arginase activity to the control level. This can be related to the stabilization cell Ca²⁺-homeostasis, which makes it possible to prevent Alzheimer's disease development.

Alzheimer's disease – ornithinecarbamoyltransferase – arginase – parathormon

Болезнь Альцгеймера (БА) – дегенеративное заболевание центральной нервной системы, характеризующееся прогрессирующим снижением интеллекта, расстройством памяти и изменением поведения. Причиной БА является отложение β -амилоидного пептида в ткани мозга с образованием нерастворимых фибрилл, нарушающих структуру и функции нервных клеток. β -амилоид – продукт изменения конформации нейроспецифического белка, образуется частичным протеолизом более крупного предшественника – APP (amyloid precursor protein) [6,12].

К настоящему времени болезнь хорошо изучена, характеризуется церебральной атрофией, утратой нейронов и синапсов, грануловакуолярной дегенерацией, глиозом, амилоидной ангиопатией, а также присутствием сенильных бляшек и альцгеймеровским перерождением нейрофибрилл. Кроме гибели нервных клеток, при БА в мозгу меняется уровень экспрессии белков, связанных с пластичностью или регенерацией. Меняется также активность ряда ферментов, причем заслуживает внимания тот факт, что не все из них связаны с определенными нейротрансмиттерными системами. Меняется активность ряда пептидаз, фосфатидилинозитолкиназы, фосфатидилинозитолфосфаткиназы, β -глюкуронидазы и холинтрансферазы [13]. Исследование тиаминзависимых ферментов в образцах височных долей обнаружило значительное падение активности ПВ-дегидрогеназы, α КГ-дегидрогеназы и транскетолазы у больных. Напротив, активность глутаматдегидрогеназы была в пределах нормы. На основании этого авторы сделали предположение о вероятной роли изменений в метаболизме или утилизации тиамина в развитии БА [5].

Материал и методика. Эксперименты проводились в сотрудничестве с лабораторией нейро-эндокринных взаимодействий Института физиологии НАН РА им. акад. Л.А. Орбели. Объектом служили крысы-самцы линии Альбино (250 ± 20 г). β -амилоидный пептид A_{β} (25-30), агрегированный согласно Maurice et al. [8] (1 мг/мл в стерильной дистиллированной воде при 37°C в течение 4 сут), инъецировался в латеральные желудочки мозга с обеих сторон.

Паратиреоидный гормон (ПТГ) вводился внутримышечно (10^{-9} М, 0,7 мл) в течение первой послеоперационной недели ежедневно, начиная со второго дня интоксикации. Животных забивали спустя 15-23 недели после введения A_{β} (25-35). Орнитинкарбамоилтрансферазная (ОКТ) и аргиназная активность определялась в мозгу, печени, почках и селезенке контрольных и подвергнутых интоксикации β -амилоидом крыс, а также после системного введения интоксифицированным крысам ПТГ.

Гомогенизация органов проводилась в гомогенизаторе типа Поттера-Эльвейема тефлоновым пестиком. 20%-ный гомогенат центрифугировался для удаления ядерной фракции и неразрушенных клеток (3000 об/мин, 5 мин). В опытах использовалась надосадочная жидкость (экстракт).

Активность ОКТ определялась методом арсенолиза цитрулина [1].

Аргиназная активность измерялась по методу Ратнер и Паппас [11]. Активность выражалась в мкМ мочевины. Мочевину определяли методом Арчибальда в модификации Мура [10].

Результаты и обсуждение. В ряду вышеупомянутых данных об изменении активности ряда ферментов при БА, в том числе не связанных с определенными нейротрансмиттерными системами, наше внимание привлекло обнаружение экспрессии гена ОКТ – ключевого фермента цикла мочевины в мозгу больных БА, тогда как он отсутствует у контрольных субъектов. Обнаружена также экспрессия всех других ферментов цикла в мозгу больных [4]. Кроме того, увеличивается активность ОКТ в цереброспинальной жидкости. Авторы допускают включение нового пути цикла мочевины в мозгу [4]. Ранее было доказано отсутствие в мозгу орнитинового цикла [2].

Исходя из вышеизложенного, мы решили исследовать активность двух ферментов цикла мочевины – ОКТ и аргиназы в мозгу, печени, почках и селезенке крыс при интоксикации амилоидным пептидом A_{β} (25-35), а также последующем системном введении ПТГ. Применение ПТГ вызвано тем, что в клетке поступление, депонирование и выделение Ca^{2+} регулируется весьма сложной системой, где среди других факторов важная роль принадлежит паратгормону. Поскольку существенную роль в патогенезе БА играет нарушение клеточного Ca^{2+} -гомеостаза (КСаГ) в нервной ткани, ведущее к повышенной выработке и накоплению β -амилоидного пептида в результате изменений в молекуле APP [7, 9], стабилизация КСаГ может способствовать предотвращению развития БА.

Данные об активности ОКТ и аргиназы в мозгу и других органах крыс при интоксикации амилоидным пептидом A_{β} (25-35) и последующем системном введении ПТГ представлены в табл. 1 и 2.

Согласно данным табл. 1, ОКТ, отсутствуя в мозгу интактных крыс (ввиду отсутствия там орнитинового цикла), обнаруживается в нем через 15 недель после интоксикации амилоидным пептидом.

Таблица 1. Активность ОКТ в экстрактах гомогенатов различных органов крыс при интоксикации A_{β} (25-35) и последующем системном введении ПТГ (мкМ NH_3 /г ткани). $n=4$

Орган	К	A_{β} 15 нед.	A_{β} + ПТГ, недели					
			15	16	17	18	19	23
Мозг	0	$2,30 \pm 0,08$	0	–	0	–	–	–
Печень	$30,50 \pm 1,30$	$9,60 \pm 0,31$	$12,76 \pm 0,02$	$18,80 \pm 0,02$	$11,30 \pm 0,20$	$12,0 \pm 0,21$	$17,70 \pm 0,41$	$28,40 \pm 0,50$
Почки	$19,80 \pm 0,90$	$14,34 \pm 0,52$	$10,41 \pm 0,16$	$7,10 \pm 0,03$	$2,84 \pm 0,06$	$3,70 \pm 0,05$	$1,06 \pm 0,02$	0
Селезенка	$1,42 \pm 0,02$	$2,27 \pm 0,02$	$5,10 \pm 0,10$	$6,10 \pm 0,13$	$5,51 \pm 0,12$	$6,03 \pm 0,10$	$4,94 \pm 0,06$	$1,77 \pm 0,08$

Однако в тот же срок после интоксикации, но при последующем введении ПТГ, т.е. в условиях стабилизации КСаГ, что может способствовать предотвращению развития БА, активность ОКТ отсутствует. Она отсутствует также через 17 недель. Для других сроков данных нет, так как мозг забирался для патоморфологического анализа.

Результаты патоморфологического анализа срезов мозга крыс, получавших A_{β} , выявили значительную дегенерацию клеток почти всех областей гиппокампального комплекса, а электрофизиологические исследования обнаружили отклонения от нормы. В условиях применения ПТГ наблюдались реабилитационные сдвиги к норме [3].

Активность ОКТ в печени и почках падает после интоксикации, а в селезенке повышается. При введении ПТГ активность фермента в печени начинает повышаться и к концу эксперимента (23 недели) достигает активности у интактных крыс. Подобного положительного влияния ПТГ в случае фермента почек не наблюдается: понизившись после интоксикации, активность его продолжает падать и после введения ПТГ и к концу эксперимента достигает нуля.

Если через 15 недель после интоксикации амилоидным пептидом изменения в уровне аргиназной активности печени, почек и селезенки незначительны, то в мозгу она повышена почти в 2 раза ($91,3$ вместо $49,5$ в контроле) (табл.2). Подобное изменение уровня активности аргиназы совпадает с обнаружением ОТК в мозгу через 15 недель интоксикации. В тот же срок, но при введении ПТГ, т.е. в условиях, способствующих предотвращению развития БА, аргиназная активность понижена ($74,2$ вместо $91,3$), а через 17 недель она уже порядка контрольной.

Таблица 2. Активность аргиназы в экстрактах гомогенатов различных органов крыс при интоксикации A_{β} (25-35) и последующем системном введении ПТГ (мкМ мочевины/г ткани). $n=4$

Орган	К	A_{β} 15 нед.	A_{β} + ПТГ, недели					
			15	16	17	18	19	23
Мозг	49,5±2,70	91,3±2,80	74,2±5,20	—	40,4±2,9	—	—	—
Печень	13500±22	12600±98	13100±208	10350±155	5040±78	4050±63	3690±59	14100±105
Почки	640±34	756±45	460±48	432±28	558±29	403±40	378±35	532±36
Селезенка	65,2±4,13	60,7±3,80	59,8±2,70	62,1±3,70	50,4±2,80	48,2±3,10	47,2±2,30	58,5±4,10

Что касается печеночного фермента, то его активность через 15 недель после интоксикации, как и при введении ПТГ после интоксикации, фактически не меняется. В более продолжительные сроки она падает, но к концу опыта достигает уровня контроля.

Активность аргиназы почек и селезенки, несколько колеблясь в разные сроки, тем не менее близка к контрольной.

Среди данных по влиянию интоксикации амилоидным пептидом и последующего системного введения ПТГ на активность двух исследованных ферментов орнитинового цикла в различных органах крыс особый интерес представляет появление в мозгу интоксифицированных животных ОКТ — ключевого фермента цикла, отсутствующего в мозгу. Примечательно, что параллельно почти в два раза повышается активность аргиназы, которая хотя и присутствует в мозгу, но не связана с циклом мочевины (неуротелическая форма). Можно допустить, что увеличение аргиназной активности, возможно, связано с участвующей в цикле мочевины уреотелической формой фермента, что согласуется с предположением о появлении в мозгу страдающих БА нового пути цикла мочевины [4].

Отсутствие в мозгу животных, получавших после интоксикации ПТГ, активности ОКТ и падение аргиназной активности до уровня контроля может быть связано с участием паратгормона в стабилизации КСаГ, способствующей предотвращению БА.

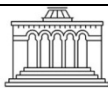
Авторы выражают благодарность за предоставление экспериментального материала Института физиологии им. Л.А. Орбели НАН РА и кафедре нормальной физиологии ЕГМУ им. М. Гераци

ЛИТЕРАТУРА

1. Браунштейн А.Е., Северина И.С., Барская Ю.Е. О торможении орнитинового цикла мочевинообразования метил-DL-аспарагиновой кислотой. Биохимия, 21, с.738-745, 1956.
2. Давтян М.А. Ферменты орнитинового цикла в мозгу. Докт. дисс. 1970.
3. Мнацаканян В.Р., Худавердян Д.Н., Меликсетян И.Б., Чавушян В.А., Саркисян Дж.С. Электрофизиологическое и гистохимическое изучение эффекта паратиреоидного гормона на A_{β} индуцированной модели болезни Альцгеймера. Материалы Международной научной конференции "Актуальные проблемы интегративной деятельности и пластичности нервной системы", посвященной 80-летию со дня рождения акад. В.В.Фанарджяна, Ереван, с. 207-212, 2009.
4. Bensemain F, Hot D, Ferreira S, Dumont J, Bombois S, Maurage CA, Huot L, Hermant X, Levillain E, Hubans C, Hansmannel F, Chapuis J, Hauw JJ, Schraen S, Lemoine Y, Buée L., Berr C., Mann D., Pasquier F., Amouyel P, Lambert J.C. Evidence for induction of the ornithine transcarbamylase expression in Alzheimer's disease. Mol. Psychiatry, 14, 1, 106-116, 2009.

5. *Butterworth R.F., Besnard A.M.* Thiamine-dependent enzyme changes in temporal cortex of patients with Alzheimer's disease. *Metab Brain Dis.* 5, 4, 179-84, 1990.
6. *Kitaguchi N., Takahashi Y., Tokushima Y., Shiojiri S., Ito H.* Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. *Nature.* 331, 6156, 530-532, 1988.
7. *Mattson M.P., Chan S.L.* Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease. *Cell Calcium.*, 34, 4-5, 385-97, 2003.
8. *Maurice T., Privat A.* Sigma 1 receptor agonists and neurosteroids attenuate beta 25–35-amyloid peptide-induced amnesia in mice through a common mechanism. *Neuroscience*, 83, 413-428, 1998.
9. *Miller D.W., Cookson M.R., Dickson D.W.* Glial cell inclusions and the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Neuron Glia Biol.*, 1, 13-21, 2004.
10. *Moore R.B., Kauffman N.J.* Simultaneous determination of citrulline and urea using dia-cetylmonoxime. *Anal Biochem.*, 33, 2, 263-72, 1970.
11. *Ratner S., Pappas A.* *Biosynthesis of urea I.* Enzymic mechanisms of arginine synthesis from citrulline. *J. Biol. Chem.*, 179, 1183-1198, 1949.
12. *Sinha, S., Dovey, H. F., Seubert, P., Ward, P. J., Blancher, R. W., Blaber, M., Bradshaw, R. A., Arici, M., Mobley, W. C., Lieberburg, I.* The Protease Inhibitory Properties of the Alzheimer's Beta-Amyloid Precursor Protein. *J. Biol. Chem.*, 265, 8983-8985, 1990.
13. *Terwel D., Bothmer J., Wolf E., Meng F., Jolles J.* Affected enzyme activities in Alzheimer's disease are sensitive to antemortemhypoxia. *J. Neurol. Sci.*, 161, 1, 47-56, 1998

Поступила 19.06.2015



•Փորձարարական և տեսական հոդվածներ•*Экспериментальные и теоретические статьи*

•Experimental and theoretical articles•

Биолог. журн. Армении, 4 (67), 2015

**НОВЫЕ ДАННЫЕ ОБ ИНГИБИТОРАХ ФЕРМЕНТОВ,
МОДИФИЦИРУЮЩИХ АНТИБИОТИКИ**

Н.А. ОГАНЕСЯН

НПЦ "Армбиотехнология" НАН РА
arm_biotech@yahoo.com, nellig@yahoo.fr

Число бактериальных инфекций, устойчивых к антибиотикам, постоянно растет, что приводит к повышению уровня смертности. Предложены разные способы преодоления этой проблемы. Устойчивость бактерий к бета-лактамам и аминогликозидам в основном обусловлена присутствием бета-лактамаз и модифицирующих аминогликозиды ферментов. Наиболее удачным способом восстановления активности антибиотиков является использование их с ингибиторами ферментов. В настоящем обзоре обсуждаются последние данные, касающиеся изучения ингибиторов бета-лактамаз и модифицирующих аминогликозиды ферментов.

*Антибиотик – ингибитор – бета-лактамаза – фермент,
модифицирующий аминогликозиды*

Հակաբիոտիկների նկատմամբ կայուն ինֆեկցիոն մանրէների թիվը շարունակ աճում է, ինչը բերում է մահվան դեպքերի աճին: Այդ խնդրի լուծման համար առաջարկվել են տարբեր եղանակներ: Բետա-լակտամների և ամինագլիկոզիդների նկատմամբ կայունությունը հիմնականում պայմանավորված է բակտերիաներում բետա-լակտամազների և ամինագլիկոզիդներ մոդիֆիկացնող ֆերմենտների առկայությամբ: Հակաբիոտիկների օգտագործումը ֆերմենտների արգելակիչների հետ միասին հակաբիոտիկների ակտիվության վերականգման առավել արդյունավետ եղանակներից է: Տվյալ ակնարկում քննարկվում են բետա-լակտամազային և ամինագլիկոզիդներ մոդիֆիկացնող ֆերմենտների արգելակիչների ուսումնասիրության վերաբերյալ վերջին տվյալները:

Հակաբիոտիկ – արգելակիչ – բետա-լակտամազ – ամինագլիկոզիդներ ձևափոխող ֆերմենտ

The number of bacterial infections resistant to antibiotics is growing up day by day with a significant impact on the mortality. Various strategies have been investigated to overcome this problem. Bacterial resistance to beta-lactams and aminoglycosides predominantly occurs through production of beta-lactamases and aminoglycoside-modifying enzymes. The most successful way to restore antibiotics activity is the use of antibiotics together with enzymes inhibitors. In this review recent data concerning the research of beta-lactamases and aminoglycoside-modifying enzymes inhibitors are discussed.

Antibiotic – inhibitor – beta-lactamase – aminoglycoside-modifying enzyme

Антибиотики это природные или синтетические соединения, убивающие бактерии. Открытие первых антибиотиков произвело революцию в лечении инфекционных заболеваний, представляющих большую угрозу для жизни человека и животных. Однако при длительном лечении антибиотиками, преимущественно в

клиниках, стали выделяться штаммы патогенных бактерий, которые обладают устойчивостью к одному или нескольким антибиотикам. Появление и быстрое распространение резистентных к антибиотикам инфекций признано опасным явлением, препятствующим лечению инфекционных заболеваний. Исследования выявили несколько механизмов, обеспечивающих устойчивость бактерий к антибиотикам. Это модификация мишени действия антибиотика, нарушение проницаемости микробной клетки, активное выведение антибиотика из клетки с помощью специальной системы - multi drug efflux systems [17].

Наиболее распространенной причиной приобретения устойчивости бактерий к антибиотикам является присутствие ферментов, модифицирующих антибиотики. С таким механизмом устойчивости борьба ведется в следующих направлениях:

- создание новых антибиотиков, не подвергающихся воздействию ферментов;
- поиск ингибиторов ферментов, инактивирующих антибиотики;
- обеспечение контроля над регуляцией экспрессии ферментов, инактивирующих антибиотики.

Относительно первого направления необходимо отметить, что работы по созданию новых антибиотиков ведутся непрерывно и довольно успешно. Несмотря на интенсивные попытки модифицировать антибиотики, многие бактериальные штаммы достаточно быстро приобретают устойчивость к каждому из новых антибиотиков, внедряемых в клиники. Перспективным направлением является воздействие на регуляцию экспрессии ферментов, инактивирующих антибиотики. Современная медицина предусматривает также комбинирование использования антибиотиков, в том числе в паре с другими лекарствами.

Ферменты, разрушающие либо модифицирующие антибиотики, широко распространены среди бактерий. В данном обзоре рассматриваются вопросы, связанные с поиском и созданием ингибиторов ферментов, модифицирующих бета-лактамовые антибиотики и аминогликозиды.

Ингибиторы бета-лактамаз

Бета-лактамы принадлежат к одному из трех наиболее крупных классов антибиотиков. Представители этого класса проявляют высокую эффективность при лечении различных бактериальных инфекций уже более 60-ти лет, составляя более 65% рынка всех антибиотиков. Однако параллельно с их применением возникает проблема распространения клинических, устойчивых к бета-лактамам бактериальных штаммов.

Бактерии приобретают устойчивость к бета-лактамовым антибиотикам в основном двумя путями: синтез бактериями бета-лактамаз, разрушающих лактамовое кольцо антибиотика и приобретение мутации в пенициллин связывающем белке (РВР), которая приводит к понижению аффинности белка к большинству бета-лактамовых антибиотиков [28]. На сегодняшний день наиболее успешным подходом к преодолению устойчивости бактерий к бета-лактамовым антибиотикам является поиск ингибиторов бета-лактамаз.

Существует два типа бета-лактамаз, структурно отличающихся друг от друга.

1) ***Сериновые бета-лактамазы***. К сериновым бета-лактамазам относится широкий спектр бета-лактамаз (**ESBL**—extended spectrum beta-lactamases) и карбапенемазы, гидролизующие карбапены, например, карбапенемаза *Klebsiella pneumoniae* (**KPC**) [1].

2) **Металло-бета-лактамазы (MBL)**. Металло-бета-лактамазы - это цинк-зависимые ферменты, подвергающие гидролизу почти все бета-лактамовые антибиотики, включая карбапенемы. Активный центр этих ферментов способен связываться с большинством бета-лактамов.

Устойчивость к бета-лактамовым антибиотикам может быть обусловлена также тем, что бактерии приобретают плазмиды, содержащие несколько генов, кодирующих бета-лактамазы различных классов. В последнее время были выявлены грам-отрицательные бактерии, которые содержат плазмиды с генами, кодирующими несколько MBLs, включая New-Dehli металло-бета-лактамазу (**NDM-1**) [6]. Такие плазмиды быстро распространяются среди различных видов бактерий. В результате появляются бактерии, обладающие множественной устойчивостью (**MDR** - multiple drug resistance) ко всем известным лактамовым антибиотикам [2].

Для подавления роста устойчивых штаммов было предложено использовать ингибиторы бета-лактамаз в паре с антибиотиком.

Клавулановая кислота, выделенная из *Streptococcus clavuligerus* в 1972 г., оказалась одним из первых ингибиторов многих сериновых бета-лактамаз [10]. Клавулановая кислота, благодаря наличию лактамового кольца, связывается с активным центром фермента, проявляя свойства конкурентного ингибитора. При формировании комплекса происходит либо временное ингибирование активности фермента, либо необратимое инактивирование фермента [23]. В 1984 г. клавулановая кислота была внедрена в клиники для использования в паре вместе с амоксициллином под коммерческим названием **аугментин (Augmentin)** Это был первый опыт успешного использования комбинации бета-лактамовый антибиотик/ингибитор бета-лактамазы против бактериальных инфекций. В 2001 г. аугментин оказался наиболее продаваемым лекарством. После аугментина были синтезированы и другие ингибиторы бета-лактамаз, демонстрирующие хорошие результаты в экспериментах *in vitro*. К таким соединениям относится, например, соединение BLI-489, которое представляет собой имидазол, замещенный 6-метилиден-пенем и трициклический карбапенем LK-157 [19, 18].

Бета-лактамовые ингибиторы класса диаза-бицикло-октана (DBO) появились в середине 1990-х. Это класс ингибиторов не лактамового происхождения. Ингибиторы класса DBO ингибируют сериновые бета-лактамазы, включая ESBLs и KPCs, но они не активны по отношению к MBL [5]. Два из DBO ингибиторов - МК-7655 и авибактам (**Avibactam**) находятся на стадии клинических испытаний. Препарат МК-7655 повышает чувствительность к имипенему штаммов *P. aeruginosa*, содержащих бета-лактамазу AmpC, и *K. pneumoniae*, содержащих KPC [11]. Подобно другим ингибиторам бета-лактамаз, авибактам ковалентно и необратимо связывается с ферментом. В отличие от ингибиторов лактамового происхождения, авибактам, находясь с ферментом в связанном состоянии, нечувствителен к гидролизу. Деацилирование комплекса ингибитор/фермент приводит к высвобождению интактного авибактама [8]. Кроме того, авибактам не индуцирует синтез бета-лактамаз, как в случае клавулановой кислоты. Использование комбинации цефтазидин/авибактам разрешено в США для лечения инфекционных заболеваний, вызванных *Enterobacteriaceae*, устойчивых к карбопенемам. К сожалению, недавно в клиниках обнаружен штамм *K. pneumoniae*, содержащий устойчивый к цефтазидин/авибактаму фермент KPC [27]. Для лечения усложненных инфекций сегодня предлагается новая комбинация цефалоспорины и ингибитора бета-лактамазы цефтолозан/тазобактам [4]. Тазобактам является сильным ингибитором бета-лактамаз класса ESBL, продуцируемых *Enterobacteriaceae*, а также некоторыми анаэробными бактериями.

Среди инфекций, обладающих множественной устойчивостью к лекарствам, преобладают носители ферментов MBLs, поэтому особое внимание уделяется поиску соединений, ингибирующих этот класс бета-лактамаз. Ферменты MBLs не ингибируются применяемыми в клиниках ингибиторами бета-лактамаз. Вследствие большого разнообразия MBLs конструирование ингибиторов к этим лактамазам затруднено. Известно, что активность металлопротеаз падает в присутствии хелатирующих металлы соединений. Однако при поиске ингибиторов MBLs следует принимать во внимание тот факт, что соединения, хелатирующие металлы, обладают неспецифическим действием. Такие ингибиторы могут ингибировать не только бактериальные ферменты, но и металлосодержащие ферменты хозяина и тем самым вызвать побочные действия. Недавно были предложены два новых ингибитора MBLs: 2-фенил-4,5-дигидротиазол-4-карбоксильная кислота, ингибирующая MBL IMP-1 из *P. aeruginosa*, и 2-(3-аминофенил)-4,5-дигидротиазол-4-карбоксильная кислота, ингибирующая фермент Bla2 из *Bacillus anthracis* [3].

Многообещающие результаты демонстрируют тиозиферы аминокислот и их производные. Синтезировано десять новых производных тиозиферов аминокислот, которые обладают способностью ингибировать метало-бета-лактамазу L1, NDM-1 и ImiS. Согласно результатам, полученным путем компьютерного моделирования, эти соединения связываются с активным центром фермента L1, экспрессируемого в *E. coli* [14]. Одним из последних потенциальных ингибиторов MBLs является новое соединение NOTA [21].

Ингибиторы ферментов, модифицирующих аминогликозидные антибиотики.

Стрептомицин был выделен из *Streptomyces griseus* в 1944 г. и оказался первым эффективным аминогликозидным антибиотиком, применяемым для лечения туберкулеза. Аминогликозидные антибиотики – это группа антибактериальных соединений, состоящих из двух и более модифицированных аминсахаров. Широкий спектр антибактериальной активности обусловлен вмешательством аминогликозидов в процесс биосинтеза белка. Аминогликозидные антибиотики связываются с рРНК и белками 30S субъединицы бактериальной рибосомы и препятствуют сцеплению аминоацил-тРНК с антикодом. Это приводит к ошибкам трансляции и, соответственно, к изменению аминокислотной последовательности синтезируемых белков [16]. Природные аминогликозидные антибиотики продуцируются бактериями родов *Streptomyces* и *Micromonospora*, которые защищаются от действия внутренних аминогликозидов путем метилирования 16S рРНК [9]. К сожалению, аминогликозидные антибиотики обладают побочным действием, обусловленным связыванием с А-сайтом эукариотической рибосомы, который отличается от А-сайта прокариотической рибосомы одной парой оснований (нуклеотид A1408 прокариотической рибосомы соответствует G1408 эукариотической рибосомы) [15].

Устойчивость бактерий к антибиотикам семейства аминогликозидных антибиотиков чаще обеспечивается действием на антибиотики аминогликозид модифицирующих ферментов (АГМФ).

Обнаружено три вида АГМФ: аминогликозид ацетилтрансферазы (AACs), аминогликозид нуклеотидилтрансферазы (ANTs) и аминогликозид фосфотрансферазы (APHs). N-ацетилтрансферазы катализируют ацетилирование свободных аминно групп молекулы субстрата. Это наиболее распространенный среди бактерий тип АГМФ. Из различных организмов выделено более 50-ти AACs, включая уникальный фермент Eis, который способен ацетилировать аминогликозиды в различных положениях. [12]. Существует пять классов ANT, способных переносить аденозин-монофосфат на положения 6, 9, 4', 2" или 3" молекулы аминогликозида.

APHs катализируют перенос фосфатной группы на положения 4, 6, 9, 3', 2", 3" или 7". Для ANTs и APHs ко-субстратами являются АТФ и ГТФ [20].

Одним из путей преодоления устойчивости бактерий к аминогликозидным антибиотикам является “дизайн” ингибиторов АГМФ. Предполагается, что использование ингибиторов АГМФ вместе с аминогликозидными антибиотиками может защитить антибиотики от ферментов и восстановить чувствительность бактерий. После того как было показано, что Ас-СоА является ко-субстратом для AACs, в качестве ингибиторов АГМФ стали использоваться бисубстраты, состоящие из аминогликозида и Ас-СоА. Однако такие ингибиторы в экспериментах *in vivo* оказались неэффективными, по-видимому, из-за больших размеров и отрицательного заряда, не позволяющих преодолеть мембранный барьер [24]. Далее были созданы про-лекарства, состоящие из аминогликозида и пантотенового линкера. Такой линкер узнаваем бактериальными ферментами PanK (пантотенат киназа K), PPAT (фосфорибозил пироглюкаты амидотрансфераза) и DPCK (дефосфо-СоА-киназа). Внутри бактериальной клетки в результате ферментативного действия бисубстрат аминогликозид-пантотен превращается в аминогликозид-пантотен-СоА, который ингибирует активность AACs. Использование таких ингибиторов вместе с канамицином приводит к подавлению роста устойчивого к аминогликозидам штамма *Enterococcus faecium*, содержащего AAC(6')-II [25].

Недавно показано, что в качестве ингибиторов широкого спектра AACs и Eis могут служить соли целого ряда металлов [13].

Так как APHs катализируют перенос фосфатной группы на аминогликозиды, т.е. проявляют киназную активность, в качестве ингибиторов APHs могут выступать ингибиторы бактериальных или эукариотических киназ. Из более 80-ти ингибиторов киназ были выявлены соединения, обладающие потенциальной способностью ингибировать APHs. Один из них – кверцетин (quercetin) является природным ингибитором киназы 1, который способен ингибировать ряд APHs как *in vitro*, так и *in vivo* [7]. Однако при использовании ингибиторов киназ следует учесть тот факт, что они могут оказаться ингибиторами киназ человека, что может привести к нежелательным последствиям.

Чрезвычайно важно найти ингибиторы, которые могут воздействовать на широкий спектр АГМФ. С этой целью было осуществлено моделирование 45-и ингибиторов АГМФ не углеводной природы. Показано, что группа производных 3-(диметиламино)-пропиламина является наиболее перспективной среди потенциальных ингибиторов как ANTs, так и APHs [26].

Многообещающим является поиск ингибиторов АГМФ среди природных соединений. Так аранорозин, продукт выделенный из *Gymnascella aurantiaca*, ингибирует рост и MRSA, а также ингибирует AACs и APHs [22].

Заключение

Распространение бактерий, устойчивых к широкому спектру антибиотиков, представляет серьезную угрозу при лечении инфекционных заболеваний. Для решения этой проблемы проводятся исследования в разных направлениях, в том числе идет поиск путей подавления активности ферментов, разрушающих антибиотики. “Дизайн” и синтез новых соединений, способных ингибировать широкий спектр бета-лактамаз и аминогликозид модифицирующих ферментов позволяет эффективнее использовать антибиотики в борьбе с инфекционными заболеваниями. Однако в ответ на применение ингибиторов, появляются устойчивые к ним ферменты. Очевидно, что для подавления устойчивости к антибиотикам необходимо комбинировать различные подходы. Сегодня ведется поиск соединений, способных взаимодействовать одновременно с несколькими мишенями в клетке устой-

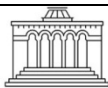
чивых к антибиотикам бактерий. Такой подход позволит избежать или замедлить селекцию устойчивых к антибиотикам мутантов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bush K., Jacoby G.A. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 3, 969-976, 2010.
2. Bush K. Alarming β -lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Curr. Opin. Microbiol.* 13, 5, 558-564, 2010.
3. Chen P., Horton L.B., Mikulski R.L., Deng L., Sundriyal S., Palzkill T., Song Y. 2-substituted 4,5-dihydrothiazole-4-carboxylic acids are novel inhibitors of metallo- β -lactamases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 19, 6229-6232, 2012.
4. Cho J.C., Fiorenza M.A., Estrada S.J. Ceftolozane/Tazobactam: A Novel Cephalosporin/ β -Lactamase Inhibitor Combination. *Pharmacotherapy*, 35, 7, 701-715, 2015.
5. Coleman K. Diazabicyclooctanes (DBOs): a potent new class of non- β -lactam β -lactamase inhibitors. *Curr. Opin. Microbiol.* 14, 550-555, 2011.
6. Cornaglia G., Giamarellou H., Rossolini G.M. Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams? *Lancet Infect. Dis.* 11, 5, 381-93, 2011.
7. Daigle D.M., McKay G.A., Wright G.D. Inhibition of aminoglycoside antibiotic resistance enzymes by protein kinase inhibitors. *J. Biol. Chem.* 272, 40, 24755-24758, 1977.
8. Ehmann D.E., Jahic H., Ross P.L., Gu R.F., Hu J., Kern G., Walkup G.K., Fisher S.L. Avibactam is a covalent, reversible, non- β -lactam β -lactamase inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 109, 29, 11663-11668, 2012.
9. Galimand M., Courvalin P., Lambert T. Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 8, 2565-2571, 2003.
10. Geddes A.M., Klugman K.P., Rolinson G.N. Introduction: historical perspective and development of amoxicillin/clavulanate. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 30, 2, 109-112, 2007.
11. Hirsch E.B., Ledesma K.R., Chang K.T., Schwartz M.S., Motyl M.R., Tam V.H. In vitro activity of MK-7655, a novel β -lactamase inhibitor, in combination with imipenem against carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 7, 3753-3757, 2012.
12. Houghton J.L., Green K.D., Pricer R.E., Mayhoub A.S., Garneau-Tsodikova S. Unexpected N-acetylation of capreomycin by mycobacterial Eis enzymes. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 4, 800-805, 2013.
13. Li Y., Green K.D., Johnson B.R., Garneau-Tsodikova S. Inhibition of aminoglycoside acetyltransferase resistance enzymes by metal salts. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 7, 4148-4156, 2015.
14. Liu X.L., Shi Y., Kang J.S., Oelschlaeger P., Yang K.W. Amino Acid Thioester Derivatives: A Highly Promising Scaffold for the Development of Metallo- β -lactamase L1 Inhibitors. *ACS Med Chem Lett.* 6, 6, 660-664, 2015.
15. Lynch S.R., Puglisi J.D., Structural origins of aminoglycoside specificity for prokaryotic ribosomes. *J. Mol. Biol.* 306, 5, 1037-1058, 2001.
16. Magnet S., Blanchard J.S., Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chem. Rev.* 105, 2, 477-497, 2005.
17. Morita Y., Tomida J., Kawamura Y. Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. *Frontiers in Microbiology.* 4, 422, 1-8, 2014.
18. Paukner S., Hesse L., Prezelj A., Solmajer T., Urleb U. In vitro activity of LK-157, a novel tricyclic carbapenem as broad-spectrum β -lactamase inhibitor. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 2, 505-511, 2009.
19. Petersen P.J., Jones C.H., Venkatesan A.M., Bradford P.A. Efficacy of piperacillin combined with the Penem β -lactamase inhibitor BLI-489 in murine models of systemic infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 4, 1698-1700, 2009.

20. Shi K., Berghuis A.M. Structural basis for dual nucleotide selectivity of aminoglycoside 2''-phosphotransferase IVa provides insight on determinants of nucleotide specificity of aminoglycoside kinases. *J.Biol.Chem.* 287, 16, 13094-13102, 2012.
21. Somboro A.M., Tiwari D., Bester L.A., Parboosing R., Chonco L., Kruger H.G., Arvidsson P.I., Govender T., Naicker T., Essack S.Y. NOTA: a potent metallo- β -lactamase inhibitor. *J Antimicrob Chemother.* 70, 5, 1594-1596, 2015.
22. Suga T., Ishii T., Iwatsuki M., Yamamoto T., Nonaka K., Masuma R., Matsui H., Hanaki H., Omura S., Shiomi K. Aranzosin circumvents arbekacin-resistance in MRSA by inhibiting the bifunctional enzyme AAC(6')/APH(2''). *J.Antibiot.* 65, 10, 527-529, 2012.
23. Therrien C., Levesque R.C. Molecular basis of antibiotic resistance and beta-lactamase inhibition by mechanism-based inactivators: perspectives and future directions. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 3, 251-62, 2000.
24. Vong K., Auclair K. Understanding and overcoming aminoglycoside resistance caused by N-6'-acetyltransferase. *Med.Chem.Comm.* 3, 4, 397-407, 2012.
25. Vong K., Tam I.S., Yan X., Auclair K. Inhibitors of aminoglycoside resistance activated in cells. *ACS Chem.Biol.* 7, 3, 470-475, 2012.
26. Welch K.T., Virga K.G., Whittemore N.A., Ozen C., Wright E., Brown C.L., Lee R.E., Serpersu E.H. Discovery of non-carbohydrate inhibitors of aminoglycoside-modifying enzymes. *Bioorg. Med. Chem.* 13, 22, 6252-6263, 2005.
27. Winkler M.L., Papp-Wallace K.M., Hujer A.M., Domitrovic T.N., Hujer K.M., Hurless K.N., Tuohy M., Hall G., Bonomo R.A. Unexpected challenges in treating multidrug-resistant Gram-negative bacteria: resistance to ceftazidime-avibactam in archived isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 2, 1020-1029, 2015.
28. Worthington R.J., Melander Ch. Overcoming Resistance to β -Lactam Antibiotics. *Org. Chem.* 78, 9, 4207-4213, 2013.

Поступила 30.09.2015



Биол. журн. Армении, 4 (67), 2015

КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПОВЕДЕНИЯ АСТРОЦИТА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ КАЛЬЦИЕВЫХ КОЛЕБАНИЙ ПОСТСИНАПТИЧЕСКОГО НЕЙРОНА

А.С. ЧОБАНЯН, А.Л. ГРИГОРЯН, А.А. МЕЛКОНЯН, О.А. МКРТЧЯН

Институт физиологии им. Л.А. Орбели НАН РА
anahit@inbox.ru

Предложена математическая модель поведения астроцита при различных условиях кальциевых колебаний постсинаптического нейрона. Разработанная модель астроцита может использоваться для исследования долгодлящейся синаптической пластичности в трипартитном синапсе (ТПС).

Модель астроцита – кальциевые колебания постсинаптического нейрона

Առաջադրված է աստրոցիտի վարքագծի մաթեմատիկական մոդել պոստսինապտիկ նեյրոնի կալցիումի տատանումների տարբեր պայմաններում: Աստրոցիտի մոդելը կարող է օգտագործվել եռմասանի սինապտոս էրկարատոս սինապտիկ ճկունության ուսումնասիրման ժամանակ:

Աստրոցիտի մոդելը – կալցիումի տատանումները պոստսինապտիկ նեյրոնում

A mathematical model of the behavior of astrocyte in different conditions of calcium oscillations of postsynaptic neuron was proposed. The developed model of astrocyte can be used to study the long synaptic plasticity in tripartite synapse.

Model of astrocyte – calcium oscillations of postsynaptic neuron

Многочисленные нейрофизиологические исследования (за последние два десятилетия) функции глиальных клеток выявили следующее: не только нейроны участвуют в передаче информации в мозгу, но и глиальные клетки играют большую роль в обработке информации в ЦНС [9, 10]. Среди разных типов глиальных клеток именно астроциты являются основным механизмом долгодлящейся синаптической пластичности и, следовательно, играют важную роль в клеточных процессах обучения и памяти [2].

В настоящей работе представлено математическое описание поведения астроцита при различных условиях кальциевых колебаний постсинаптического нейрона. Именно характер изменения кальциевых колебаний вызывает различные процессы, протекающие в астроците, приводящие или к долгодлящейся потенциации или к долгодлящейся депрессии в синапсе.

Материал и методика. Возможны 2 формы характера изменения кальциевых колебаний постсинаптического нейрона. Первой формой являются внутриклеточные кальциевые колебания постсинаптического нейрона, полученные при высокочастотной тетанической стимуляции пресинаптического нейрона. Соответственно получаются экстраклеточные кальциевые колебания, которые являются симметричным изменением кальциевых колебаний постсинаптического нейрона [14]. Тогда работа астроцита происходит следующим образом: экстраклеточные колебания Ca^{2+} вызывают активацию метаботропических кальций-чувствительных рецепторов (CaRs) мембраны астроцита [4, 5]. Активация этих рецепторов приводит к образованию второго мессенджера – инозитолтри-фосфата (IP_3) [13], что приводит к активации IP_3 рецепторов мембраны запаса кальция астроцита, которые являются кальциевыми каналами [7]. Активация этих каналов приводит к выходу Ca^{2+} из запаса астроцита, что приводит к активации астроцита, т.е. образованию кальциевых колебаний внутри астроцита [12]. Изменение $[\text{Ca}^{2+}]$ в астроците после поступления k -ого импульса описывается следующим уравнением:

$$\text{Ca_Ast}(t_k^+) = \text{Ca_Ast}(t_k^-) + K1 * (\text{Ca_Post}(t_k^-) - 1),$$

где $\text{Ca_Ast}(t_k^-) - [\text{Ca}^{2+}]$ в астроците перед подачей k -ого импульса,

$\text{Ca_Post}(t_k^-) - [\text{Ca}^{2+}]$ в постсинапсе перед подачей k -ого импульса,

$K1$ - постоянный параметр модели астроцита.

Изменение $[\text{Ca}^{2+}]$ в астроците для $t_k^+ < t < t_{k+1}$ описывается следующим уравнением:

$$\text{Ca_Ast}(t_{k+1}^-) = \text{Ca_Ast}(t_k^+) * \exp(-(t - t_k) / \tau_{a1}),$$

где τ_{a1} - постоянный параметр модели астроцита

Активация астроцита приводит к выделению глутамата из астроцита в экстраклеточное пространство [2]. Количество передатчика, высвобожденного астроцитом после поступления k -ого пресинаптического импульса, описывается следующим уравнением:

$$\text{Glut_Ast}(t_k^+) = \text{Glut_Ast}(t_k^-) + K2 * \text{Ca_Ast}(t_k^+),$$

где $\text{Glut_Ast}(t_k^-)$ – концентрация глутамата в экстраклеточном пространстве перед поступлением k -ого импульса

$K2$ – постоянный параметр модели астроцита.

Изменение количества медиатора в экстраклеточном пространстве для $t_k^+ < t < t_{k+1}$ описывается следующим уравнением:

$$\text{Glut_Ast}(t_{k+1}^-) = \text{Glut_Ast}(t_k^+) * \exp(-(t - t_k) / \tau_{a2}),$$

где τ_{a2} – постоянный параметр модели астроцита.

Второй формой характера изменения кальциевых колебаний являются внутриклеточные кальциевые колебания постсинаптического нейрона, полученные при низкочастотной тетанической стимуляции пресинаптического нейрона. Соответственно получаются экстраклеточные кальциевые колебания, которые являются симметричным изменением кальциевых колебаний постсинаптического нейрона [13]. Тогда работа астроцита происходит следующим образом: экстраклеточные кальциевые колебания вызывают активацию определенных метаботропических кальций-чувствительных рецепторов мембраны астроцита. Активация этих рецепторов приводит к образованию паратгормона [14]. Паратгормон выводит Ca^{2+} из астроцита в экстраклеточное пространство для создания гомеостаза в ЦНС. Уменьшение Ca^{2+} внутри астроцита активирует Са-АТФ-аза насос, который связывается с Ca^{2+} и выводит его из запаса [3,8]. В данном случае Ca^{2+} служит вторым мессенджером для возникновения Ca^{2+} -волн внутри астроцита.

Изменение $[\text{Ca}^{2+}]$ в астроците после прихода k -ого пресинаптического импульса описывается следующим уравнением:

$$\text{Ca_Ast}(t_k^+) = \text{Ca_Ast}(t_k^-) - K3 * (\text{Ca_Post}(t_k^-) - 1),$$

где $Ca_Ast(t_k^-)$ - $[Ca^{2+}]$ в астроците перед подачей k -ого импульса,
 $Ca_Post(t_k^-)$ - $[Ca^{2+}]$ в пресинапсе перед подачей k -ого импульса,
 $K3$ -постоянный параметр модели астроцита.
 Изменение $[Ca^{2+}]$ в астроците для $t_k^+ < t < t_{k+1}$ описывается следующим уравнением:

$$Ca_Ast(t_{k+1}^-) = Ca_Ast(t_k^+) \cdot \exp(-(t - t_k)/\tau_3),$$

где τ_3 – постоянный параметр модели астроцита.

Активация астроцита приводит к выделению аденозинтрифосфата (АТФ) в экстра-
 синаптическое пространство [2]. Количество передатчика, высвобожденного астроцитом после
 поступления k -ого пресинаптического импульса, описывается следующим уравнением:

$$ATP_Ast(t_k^+) = ATP_Ast(t_k^-) + K4 \cdot Ca_Ast(t_k^+),$$

где $K4$ - постоянный параметр модели астроцита

$ATP_Ast(t_k^-)$ - количество медиатора в экстраинаптическом пространстве перед
 поступлением k -ого импульса.

Изменение количества медиатора в экстраинаптическом пространстве для $t_k^+ < t < t_{k+1}$ описывается следующим уравнением:

$$ATP_Ast(t_{k+1}^-) = ATP_Ast(t_k^+) \cdot \exp(-(t - t_k)/\tau_4);$$

где τ_4 – постоянный параметр модели астроцита.

Результаты и обсуждение. В настоящей работе представлены результаты
 математического моделирования поведения астроцита, полученные при различных
 условиях кальциевых колебаний постсинаптического нейрона. На рис.1. пред-
 ставлены результаты моделирования поведения астроцита в случае первой формы
 характера изменения кальциевых колебаний постсинаптического нейрона, по-
 лученной при раздражении пресинаптического нейрона тетанической стимуляцией
 высокой частоты (30 импульсов с частотой 100 гц).

Согласно рис. 1 (сплошная кривая), при высокочастотной тетанической сти-
 муляции наблюдается положительный сдвиг $[Ca^{2+}]$ в постсинапсе. $[Ca^{2+}](t_k^-) >$
 $[Ca^{2+}]_{\text{порога}}$. Чем больше положительный сдвиг $[Ca^{2+}]$ в постсинапсе (пунктирная
 кривая), тем больше амплитуда $[Ca^{2+}]$ в астроците.

Чем больше амплитуда $[Ca^{2+}]$ в астроците (точечная кривая), тем больше ко-
 личество выделенного астроцитом глутамата.

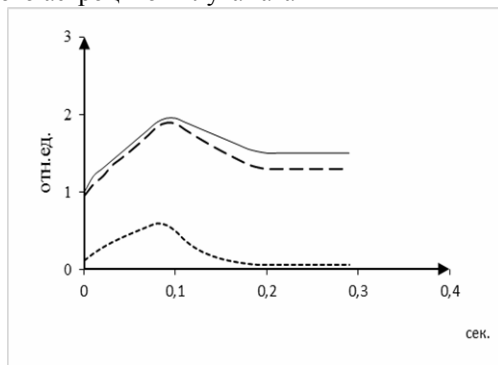


Рис.1. Сплошная кривая – реакция постсинаптического нейрона на высокочастотную
 тетаническую стимуляцию. Пунктирная кривая – изменение динамики $[Ca^{2+}]$ в астроците.
 Точечная кривая – изменение концентрации глутамата в экстраклеточном пространстве.

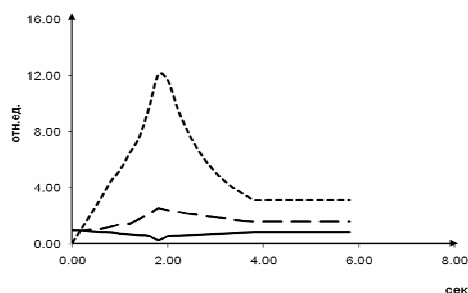


Рис.2. Сплошная кривая – реакция постсинаптического нейрона на низкочастотную тетаническую стимуляцию. Пунктирная кривая – изменение динамики $[Ca^{2+}]$ в астроците. Точечная кривая – изменение концентрации АТФ в экстраклеточном пространстве.

На рис.2. представлены результаты моделирования поведения астроцита в случае второй формы характера изменения кальциевых колебаний постсинаптического нейрона, полученной при раздражении пресинаптического нейрона тетанической стимуляцией низкой частоты (30 импульсов с частотой 5Гц).

Согласно рис. 2 (сплошная кривая), при низкочастотной тетанической стимуляции наблюдается отрицательный сдвиг $[Ca^{2+}]$ в постсинапсе $[Ca^{2+}](t_k) < [Ca^{2+}]_{\text{порог}}$. Чем больше отрицательный сдвиг $[Ca^{2+}]$ в постсинапсе, тем больше амплитуда $[Ca^{2+}]$ в астроците (пунктирная кривая). Чем больше амплитуда $[Ca^{2+}]$ в астроците (точечная кривая), тем больше количество выделенного астроцитом АТФ. Параметры модели астроцита представлены в табл. 1.

Таблица 1. Значение параметров модели астроцита

Высокочастотная стимуляция				Низкочастотная стимуляция			
K1	K2	tau1	tau2	K3	K4	tau3	tau4
1.1	0,1	6,7	1,01	1.1	0,3	100	20

Нейронные сети различных структур мозга, вовлеченные в процессы обучения и памяти, являются в настоящее время объектом пристального внимания. Поэтому на сегодняшний день раскрытие механизмов долгодлящейся синаптической пластичности имеет важное значение. Понимание механизмов долгодлящейся синаптической пластичности даст возможность исследовать работу нейронных сетей в различных структурах ЦНС, вовлеченных в процессы обучения и памяти.

На сегодняшний день многие биохимические механизмы неизвестны, поэтому разработка математических моделей химического синапса, моделирующих долгодлящуюся синаптическую пластичность, является весьма актуальной. В разработанной нами модели работа астроцита управляется концентрацией кальция в постсинапсе. В результате работы астроцит выделяет или глутамат – при высокочастотной тетанической стимуляции, или АТФ – при низкочастотной тетанической стимуляции. Выделенные астроцитом глиотрансмиттеры приводят к изменению характера работы пресинаптического нейрона, что приводит к образованию долгодлящихся форм синаптической пластичности.

В случае кальциевых колебаний постсинаптического нейрона, полученных при высокочастотной тетанической стимуляции (рис.1, сплошная кривая), выделенный астроцитом глутамат влияет на работу пресинаптического нейрона следующим образом; глутамат приводит к увеличению $[Ca^{2+}]$ в пресинапсе выше порога. Увеличение $[Ca^{2+}]$ выше порога приводит к активации протеинкиназы А (ПКА).

Активация ПКА приводит к модификации оперативного пула пресинаптического нейрона, т.е. перемещению определенного количества медиатора из запасного пула в оперативный пул в моменты подачи пресинаптических импульсов. Количество перемещенного медиатора зависит от активности ПКА перед приходом каждого пресинаптического импульса. Чем больше активность ПКА, тем больше медиатора перемещается из запасного пула в оперативный пул, что и приводит к долгодействующей потенциации [11].

В случае кальциевых колебаний постсинаптического нейрона, полученных при низкочастотной тетанической стимуляции (рис.2, сплошная кривая), выделенный астроцитом АТФ влияет на работу пресинаптического нейрона следующим образом: АТФ приводит к уменьшению $[Ca^{2+}]$ в пресинапсе ниже порога, что приводит к уменьшению активации ПКА. Уменьшение активации ПКА приводит к модификации оперативного пула пресинаптического нейрона, т.е. перемещению определенного количества медиатора из оперативного пула в запасной пул пресинаптического нейрона в моменты подачи пресинаптических импульсов. Количество перемещенного медиатора зависит от активности ПКА перед приходом пресинаптических импульсов. Чем меньше активность ПКА, тем больше медиатора перемещается из оперативного пула в запасной пул пресинаптического нейрона, что приводит к долгодействующей депрессии [11]. Разработанная модель поведения астроцита при различных условиях кальциевых колебаний постсинаптического нейрона в совокупности с предложенной ранее моделью [1] может быть использована для исследования процессов, протекаемых в ТПС.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чобанян А.С., Карапетян А.Г., Мкртчян О.А. Модель нейроглиальных взаимоотношений в процессе синаптической передачи. Биолог. журн.Армении, 2, 29-34, 2014.
2. Ben Achour S., Pascual O. Glia: The many ways to modulate synaptic plasticity. Neurochemistry international, 57, 440-445, 2010.
3. Berridge M. J. Inositol triphosphate and calcium signaling. Nature, 361, 315-325, 1993.
4. Hofer A.M. Brown E.M. Extracellular calcium sensing and signalling Mol. Cell Biol, 4, 530-538, 2003.
5. Hofer A.M. Intercellular communication mediated by the extracellular calcium- sensing receptor Cell Biology, 2, 392-397, 2003.
6. Khakh B.S., Burnstock G. The double life of ATP. Sci. Am., 301, 84-90, 2009.
7. Llano I., Dreesen J., Kano M., Konnerth A. Intradendritic release of calcium induced by glutamate in cerebellar Purkinje cell, Neuron, 7, 577-583, 1991.
8. Lytton J., Westin M., Burk S.E., Shull Ge. Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps. J. Biol. Chem, 267, 14483-14489, 1992.
9. Noori R.H. Substantial changes in synaptic firing frequencies induced by glial ATP hysteresis. Biosystems, 105, 238-242, 2011.
10. Perez A., Araque A. Astrocyte- neuron interaction at tripartite synapses. Current Drug Targets, 14, 1220- 1224, 2013.
11. Pablo E. Rab3A is essential for mossy fibre long-term potentiation in the hippocampus, Nature, 388, 590-592, 1997.
12. Rusakov D.A., Zheng K., Henneberger C. Astrocytes as regulators of synaptic function: A quest for the Ca^{2+} master key Neuroscientist, 11, 1-11, 2011.
13. Schoeppm D.D., Conn P.I. Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology. Trends Pharmacol Sci, 14, 13-20, 1993.
14. Torres A., Wang F., Qxu, Fujita T., Dobrowolski R. Extracellular Ca^{2+} acts as a mediator of communication from neurons to glia. Neuroscience, 5, 1-11, 2012.

Поступила 24.08.2015



Biolog. Journal of Armenia, 4 (67), 2015

LESSEPSIAN FISHES AT THE BOTTOM TRAWL FISHERY IN THE BABADILLIMANI BIGHT, NORTHEASTERN MEDITERRANEAN COAST OF TURKEY

E. ÇIÇEK^{1*}, D. AVSAR²

*Department of Biology, Faculty of Art and Sciences, Nevsehir Haci Bektas Veli
University, Nevsehir, Turkey*

² *Faculty of Fisheries, Cukurova University Balcali/Adana, Turkey
erdogancicek@nevsehir.edu.tr*

This study was carried out in Babadillimani Bight from May 1999 to April 2000. A total of 16 Lessepsian fish species (*Apogonichthyoides pharaonis*, *Cynoglossus sinusarabici*, *Etrumeus teres*, *Leiognathus klunzingeri*, *Lagocephalus spadiceus*, *Lagocephalus suezensis*, *Pempheris vanicolensis*, *Sargocentron rubrum*, *Saurida undosquamis*, *Siganus luridus*, *Siganus rivulatus*, *Sillago sihama*, *Sphyrna chrysotaenia*, *Stephanolepis diaspros*, *Upeneus moluccensis* and *Upeneus pori*) were identified from monthly trawl sampling. Monthly mean Catch Per Unit Effort values of Lessepsian fish species ranged from 2.47kg/h (June) to 24.81kg/h (August), and the proportion of them in total catch were calculated as 23.68%, 19.15%, 18.98% and 36.91% on spring, summer, autumn and winter, respectively. Overall mean CPUE was calculated as 7.47kg/h and mean percentage of Lessepsian fish species in total catch was estimated as 26.69% for one-year sampling period. When the distribution of Lessepsian fish species in deep layers are taking into consideration, it was presented that Lessepsian fish both in catch and number species were gradually decrease from shallow to deeper waters. 77.91% of total Lessepsian fish was caught from 0-50m depth layer, 17.01% from 50-100m depth layer, and 5.08% from water deeper than 100m.

*Lessepsian Fish – Babadillimani Bight – Northeastern Mediterranean –
bottom trawl catch composition*

Հետազոտությունը կատարվել է Բաբադիլիմանի Բայթի մոտ (Թուրքիայի հյուսիս-արևելյան միջերկրածովյան ափ) 1999թ. մայիսից՝ 2000թ. ապրիլը: Հետազոտված է լեսեփսիոն ձկների ընդամենը 16 տեսակ (*Apogonichthyoides pharaonis*, *Cynoglossus sinusarabici*, *Etrumeus teres*, *Leiognathus klunzingeri*, *Lagocephalus spadiceus*, *Lagocephalus suezensis*, *Pempheris vanicolensis*, *Sargocentron rubrum*, *Saurida undosquamis*, *Siganus luridus*, *Siganus rivulatus*, *Sillago sihama*, *Sphyrna chrysotaenia*, *Stephanolepis diaspros*, *Upeneus moluccensis* և *Upeneus pori*) ձկնորսության ամենամյա նմուշների ընտրանիից: Ուսումնասիրել են լեսեփսիոն ձկների բաշխումը խոր ջրերում: Ցույց է տրվել, որ ինչպես այդ ձկների որսը, այնպես էլ տեսակների թիվն աստիճանաբար նվազում են սակավաջրից մինչև խորը ջրերը: Ընդ որում, լեսեփսիոն ձկների ընդհանուր քանակի 77,91 % որսվել էր 0-50 մ խորության վրա, 17,01 %՝ 50-100 մ խորության վրա և 5,08%՝ 100 մ խորը ջրերից:

*Լեսեփսիոն ձկներ – Բաբադիլիմանի Բայթ – Թուրքիայի հյուսիսարևելյան
միջերկրածովյան ափ – հասակի ձկնորսացանցով ձկնորսություն*

Исследование проводили в Бабадиллиmani Байт (северо-восточное средиземноморское побережье Турции) с мая 1999 по апрель 2000 года. Изучено всего 16 видов лессеп-

сионных рыб (*Apogonichthyoides pharaonis*, *Cynoglossus sinusarabici*, *Etrumeus teres*, *Leiognathus klunzingeri*, *Lagocephalus spadiceus*, *Lagocephalus suezensis*, *Pempheris vanicolensis*, *Sargocentron rubrum*, *Saurida undosquamis*, *Siganus luridus*, *Siganus rivulatus*, *Sillago sihama*, *Sphyræna chrysotaenia*, *Stephanolepis diaspros*, *Upeneus moluccensis* and *Upeneus pori*) из образцов ежемесячной выборки трала. Изучено распределение видов лессепсионных рыб в глубоводных слоях. Показано, что как их улов, так и число видов, постепенно понижались от мелководья до глубоких вод. При этом, 77.91 % от общего количества лессепсионных рыб было выловлено на уровне 0-50 м глубины, 17.01 % – на уровне 50-100 м глубины, и 5.08 % из вод глубже 100 м.

Лессепсионные рыбы – Бабадиллиmani Байт – северо-восточное средиземноморье Турции – улов донного трала

After the opening of the Suez Canal between the Red Sea and the Mediterranean basins in 1869, many marine organisms from phytoplankton to fishes have been migrating between the Red Sea and Mediterranean. This phenomenon was termed Lessepsian migration by Por [17]. According to Ben-Tuvia [4], firstly *Aterinomorus lacunosus* was recorded by Tillier [18] 33 years after opening of the canal, and now nearly 89 Lessepsian fish species were reported from Mediterranean [6,12,13]. Lessepsian migration affected eastern Mediterranean fish communities. The Lessepsian migration was positively affected by the construction of Aswan Dam in 1969 [16]. Before the construction of the Aswan Dam, water of Nile River was a natural barrier for the Lessepsian migration, low salinity because of freshwater runoff by Nile River. There have been changing and interactions in the Mediterranean ecosystem because of continuing migration from Red Sea to eastern Mediterranean [5]. Some Lessepsian fish species (e.g. *Leiognathus klunzingeri*, *Upeneus moluccensis*, *U. pori*, *Siganus rivulatus*, *Saurida undosquamis*) successfully settled/colonized and some of the species compose of a main component of commercial fisheries in the eastern Mediterranean coasts [4, 7, 8].

The first Lessepsian fish was reported by Erazi [10] from Turkish waters. After that, many authors reported new Lessepsian fish species and up until now total number of Lessepsian fish species reached to 55 [11].

Although over 89 Lessepsian fish species have been reported from the eastern Mediterranean very little is known about the effects of these alien species on the area. In addition despite its long history, and contrary to the western Mediterranean basin, the entire area lacks long term fishery monitoring and similar studies in different localities [2].

In this study, monthly species composition, CPUE values, and proportion of Lessepsian fishes in total catch were analyzed by monthly bottom trawl survey in Babadillimani Bight is a small bight located on the western extension of the Mersin Bay.

Materials and methods. This study was carried out in Babadillimani Bight (33°23'36"-33°32'57"N; 36°07'00"-36°09'39"E) located in the western extension of the Mersin Bay, northeastern Mediterranean (fig. 1). Sampling was conducted at monthly interval using a commercial bottom trawl net from May 1999 to April 2000. Fishes were caught from 0-50m, 50-100m and 100m>depth layers by using typical Mediterranean bottom trawl net in 22mm (knot to knot) cod end mesh size, and tow duration was restricted with 1 hour. A total of 36 hauls were analyzed during the sampling period. Samples were preserved in 4% formaldehyde solution buffered by borax. In the laboratory, species identification was made by using the reference given by GOLANI *et al.* [11]. Total weight of each species was measured to the nearest 1g. Using this data, CPUE values and proportion of Lessepsian fish in whole catch were calculated.

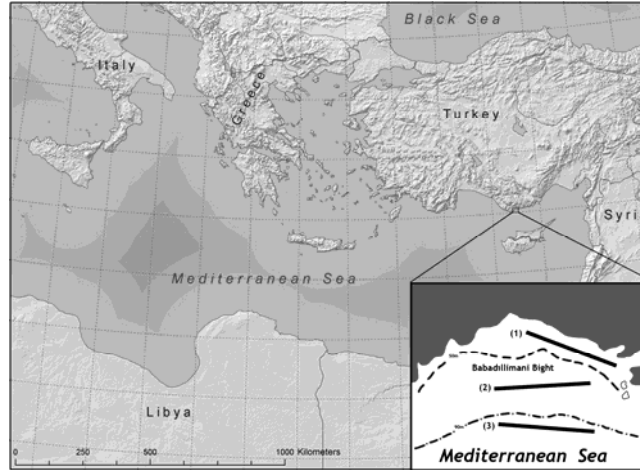


Fig. 1. Study area and sampling stations in Babadillimani Bight, northeastern Mediterranean coast of Turkey ((1) Station I: 0-50m; (2) Station II: 50-100m and (3) Station III: 100m>depth layers)

CPUE value was calculated using $a=D \cdot h \cdot X_2$ equation [14]. In this equation; a = Total dredged area by bottom trawl (km^2), D = Length of dredged area (m), h = Length of the buoy mouth of a trawl-net (m) and X_2 = Opening rate of buoy mouth: evaluated at 0.5.

The most abundant 10 species in total catch were considered as main catch recommended by Bingel [5] for this purpose, elasmobranchs and other organisms except fish were not evaluated in this point.

Monthly sea surface temperature and salinity measured by YSI 6-Series multi-parameter instrument. In order to analyze differences among stations in temperature and salinity, One-Way ANOVA was performed ($p>0.01$). The relationship between total catch and Lessepsian fish catch was estimated using linear regression analyzes and in order to analyze the relationship is statistically important or not, t-test was performed ($p>0.01$).

Monthly sea surface temperature and salinity changes were given in fig. 2. Because of there were not detected any differences among stations in temperature and salinity, (One-Way ANOVA, $p>0.05$), monthly mean values were used for analysis. During the study period, lowest mean sea surface temperature measured in March at 15.52°C . The temperature value was increased gradually after March and the value reached the highest in August at 29.66°C . After August the temperature value decreased gradually with the coming of autumn (fig. 2).

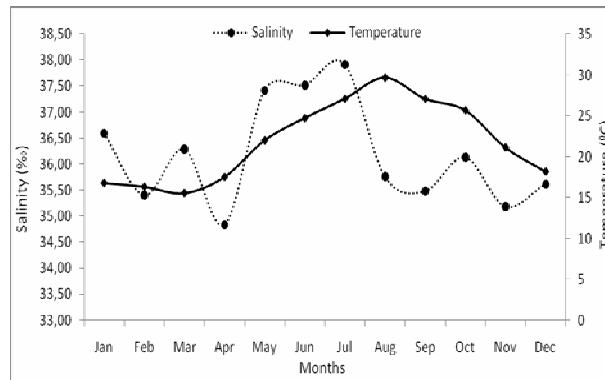


Fig. 2. Monthly changes of sea surface temperature and salinity

When considered sea surface salinity the lowest value measured as 34.83‰ following the coolest month (April). After April, sea surface salinity was increased coincide with increasing temperature and reached the highest value in July at 37.92‰. After July, sea surface salinity changes were untidy and the level ranged from 35.5 to 36.1‰.

Results and Discussion. A total of 96 teleost fish species belonging to 46 families were caught during study period. Lessepsian fish species represented 16 species belonging to 13 families among the total fish fauna as follows; *Apogonichthyoides pharaonis*, *Cynoglossus sinusarabici*, *Etrumeus teres*, *Leiognathus klunzingeri*, *Lagocephalus spadiceus*, *Lagocephalus suezensis*, *Pempheris vanicolensis*, *Sargocentron rubrum*, *Saurida undosquamis*, *Siganus luridus*, *Siganus rivulatus*, *Sillago sihama*, *Sphyræna chrysotaenia*, *Stephanolepis diaspros*, *Upeneus moluccensis* and *Upeneus pori*. *C. sinusarabici*, *S. undosquamis*, *U. moluccensis* and *U. pori* were presented all months in the study period. *L. klunzingeri* was one of the most abundant species was caught in all months, except June. *S. diaspros* was caught during 10 months, except February and May. On the contrary, *L. spadiceus* and *L. suezensis* were caught only in November; *S. chrysotaenia* was presented in January and August; *E. teres* was caught in February, August, October and November; *A. pharaonis* was presented in February, June, October, November and December.

Monthly changes in number of Lessepsian fish species was represented in fig. 3. As can be seen the figure, the lowest number of the species almost presented in station III, moreover there was not detected any species in station III. The highest value was presented in station I, except two months (January and April). Number of species was equal in March and October in station I and station II. When consider monthly value in number of species, the lowest value was presented in May with 5 species and the highest one was October and November with 8 species. There were not presented any systematic changes on number of species in studied months.

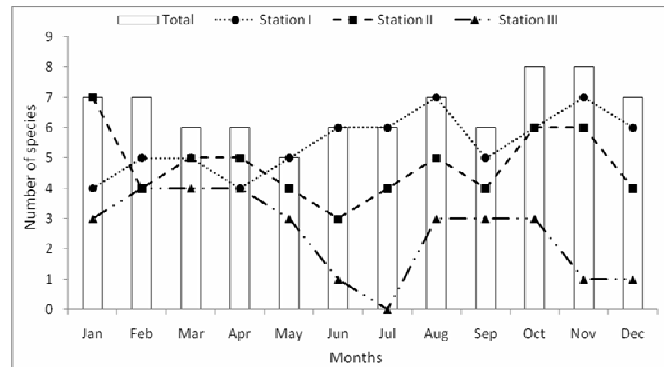


Fig. 3. Monthly changes in number of Lessepsian fish species

During the study period, the lowest total catch value was presented in March with 33.02 kg/h and the highest value was in August with the value of 308.56kg/h (fig. 4). The lowest CPUE value was 11.01 kg/h in March and the highest one was 102.86 kg/h in August and the mean value was estimated at 31.05 kg/h during the study period. Same trend presented for monthly changes of mean CPUE value of Lessepsian fish, the value ranged from 2.47kg/h (in June) to 24.81kg/h (in August), and overall mean CPUE was calculated at 7.47kg/h. Lessepsian fishes consisted of 23.68%, 19.15%, 18.98% and 36.91% in total catch on spring, summer, autumn and winter, respectively, and mean proportion was calculated as 26.69% for whole sampling period.

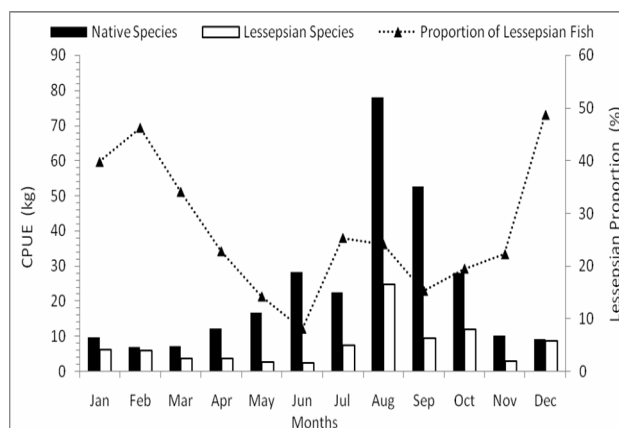


Fig. 4. Monthly changes of CPUE values of native and Lessepsian Fishes

When the consideration of proportion of Lessepsian fishes in total catch, the lowest percentage was presented in June (8.01%) and the highest one was presented in December (48.75%) (fig. 4). Generally the highest proportions were detected during the months of winter and spring. This value was decreased gradually after spring and the lowest values were presented the months in summer and autumn.

According to stations, monthly changes of Lessepsian fishes in CPUE were presented in fig. 5. As can be seen the figure, the highest CPUE value was gained from station I (0-50 m depth ranges). Except in August, CPUE value in 50-100 m depth range (station II) was higher than that of waters deeper than 100 m > depth (Station III). 77.91 % total of Lessepsian fish yield was obtained from Station I, 17.01 % from Station II and 5.08 % from Station III. Proportion of Lessepsian fish catch obtained from Station I ranged from 52.11 % (March) to 94.00 % (October). The highest and the lowest Lessepsian fish catches were presented in August and June, respectively. The profiles of monthly changes in mean Lessepsian fish CPUE value showed great similarity with between CPUE value changes in station I (fig. 5).

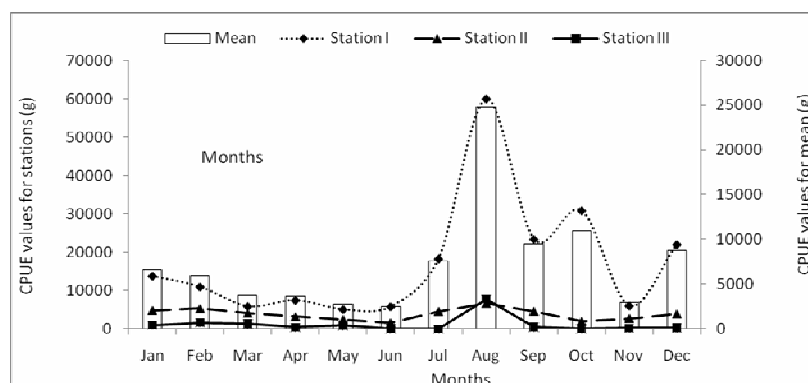


Fig. 5. Monthly changes of CPUE value of Lessepsian Fishes in stations

The relationship between mean total CPUE value and Lessepsian fishes CPUE value was represented in fig. 6. As can be seen figure, It was determined that there has been a positive and linear relationship between the total catch and value of the Lessepsian

fish catch which has been statistically significant ($p>0.01$). According to this relationship, the Lessepsian CPUE increased parallel to the increasing mean total CPUE during the study period.

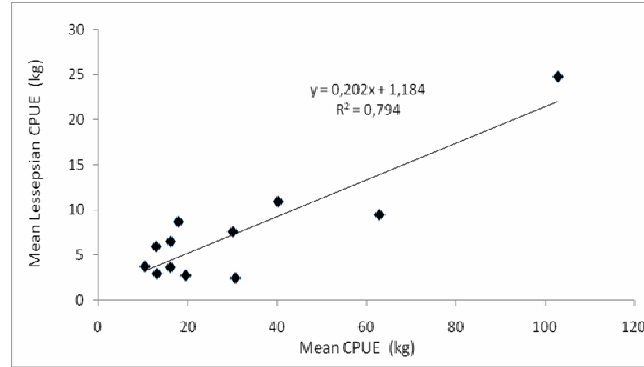


Fig. 6. Relationship between mean total CPUE and Lessepsian fish CPUE values

Monthly changes of Lessepsian fish species proportion in main catch was listed in tabl. 1. As can be seen the tab. 1, 4 Lessepsian fish species were represented in the most abundant 10 species (main catch). The proportion of Lessepsian fishes in main catch ranged from 4.9% in June to 47.58% in December. The most abundant species *S. undosquamis* represented in main catch with in all sampled months, *U. pori* was in main catch generally the coolest months, except August, in contrast *U. moluccensis* was in main catch the hottest months, except December. Other species belonging to main catch is *L. klunzingeri* was main component of main catch on 6 months.

Table 1. Monthly changes of Lessepsian Fishes proportion in main catch (rank of the fish in main catch in parenthesis)

Months	<i>S. undosquamis</i>	<i>U. moluccensis</i>	<i>U. pori</i>	<i>L. klunzingeri</i>
January	12.23 (3)	-	22.13 (1)	3.47 (7)
February	19.54 (1)	-	19.29 (2)	5.24 (5)
March	21.53 (1)	-	7.25 (4)	3.66 (10)
April	13.22 (2)	-	7.89 (4)	-
May	7.52 (4)	-	-	-
June	4.90 (5)	-	-	-
July	22.59 (1)	1.38 (10)	-	-
August	8.81 (2)	3.72 (9)	4.34 (7)	6.59 (3)
September	5.35 (5)	4.71 (6)	-	4.62 (7)
October	9.30 (2)	15.81 (1)	-	3.04 (9)
November	17.32 (1)	-	-	-
December	11.66 (2)	3.79 (6)	32.13 (1)	-

Proportion of Lessepsian fish species were estimated as 21.84%, 21.31%, 21.36% and 44.89% in total catch on spring, summer, autumn and winter, respectively, and the mean value was calculated as 26.69% for all months. Proportion of Lessepsian fish in summer were reported as 62% for İskenderun Bay, as 34% for Mersin Bay and as 27% for coastal area between İncekum and Anamur where can be representative for studied area. Indeed there were big similarity between presented value (26.69%) in this study and the value (27%) reported by Gücü *et al.* [15]. Generally Lessepsian fish abundance

in the eastern Mediterranean gradually decreases from east to western coasts [8, 11]. The values given by Gücü *et al.* (1994) support this finding. Babadillimani Bight is western extend of Mersin Bay, therefore the lowest proportion of Lessepsian fish in the study area was not surprise compared to values reported by Gücü *et al.* [15].

The highest total fish catch was obtained in August. At the same month, the highest Lessepsian catch was presented from station III. On the other hand, when the lowest catch was caught in June, there was not obtained any Lessepsian fish species from station III. It can be claim that same as reported by previous studies Lessepsian fish preferred to inhabiting shallow waters in Babadillimani Bight. However, if the catch reaches high level, Lessepsian fish distribution can be extent from shallow waters to deep one. Likewise, Watanabe *et al.* [17, 18] reported that, when Japanese Sardine has high annual catch value, because of carrying capacity, spawning ground where normally coastal areas, can be extent to oceanic deep waters.

Some of Lessepsian fish species (*E.teres*, *S.undosquamis*, *U.moluccensis*, *U. pori*, *S. chrysotaenia*, *S. shima*, *S. rivulatus* and *S. luridus*) presented in this study are commercially important species [3]. According to this finding, half of the Lessepsian fish species have economically important.

Some Lessepsian fish species were reported consist of main catch in previous studies. *S. undosquamis* [4, 7, 9], *U. moluccensis* [4, 7, 15], *U. pori* [4, 7, 9], *L. klunzingeri* [4, 7, 9] and *S. rivulatus* [4]. It can be claim that there were great similarity species compositions in main catch among this study and previous studies.

Lessepsian fish generally inhabits shallow and warm coastal area in the eastern Mediterranean [3]. Similarly almost the highest catch and CPUE value were presented from station I which located on 0-50m depth layer. Both most of Lessepsian catch and number of species were obtained from shallow waters (Station I). Indeed, Many author reported that, Lessepsian species generally distributes shallow waters [4, 9, 17]. BenYami and Glaser [5] also indicated that, in shallow water bottom trawl operations Lessepsian fish catch is one of the main components of catch; while Lessepsian fish abundance decreases with increasing dept.

However, there was not find any positive correlation between sea surface temperature and catch. On the contrary, surprisingly the highest Lessepsian fish catch was obtained during the months detected low sea surface temperature and salinity.

REFERENCES

1. Aşar D., Fisheries Biology and Population Dynamics, Nobel Press, Adana, 332 p, 2005.
2. Bariche M., Al-Zein R., Sadek, M., Diversity of juvenile fish assemblages in the pelagic waters of Lebanon (eastern Mediterranean). Hydrobiologia, 580, 109-115, 2007.
3. Ben-Tuvia A., Red Sea fishes recently found in the Mediterranean. COPEIA, 2, 254-275, 1966.
4. Ben-Tuvia A., The impact of the Lessepsian (Suez Canal) fish migration on the eastern Mediterranean ecosystem. In: Moraitou-Apostolopoulo, M., Kiortsis, V., (Eds.). Mediterranean Marine Ecosystem, Plenum Press, New York, 367-375 pp., 1985.
5. Ben-Yami M., Glaser T., The invasion of *Saurida undosquamis* (Richardson) into the Levant Basin-an example of biological effect of interoceanic canals. Fishery Bulletin, 72, 359-373, 1974.
6. Bilecenoğlu M., Kaya M., Cihangir B., Çiçek, E., An updated checklist of the marine fishes of Turkey. Turkish Journal of Zoology, 38, 901-929, 2014.
7. Bingel F., Project report of artisanal fisheries in east Mediterranean coasts. ODTU, Erdemli Institute of Marine Science, Erdemli, Turkey, 312 pp., 1987.

8. Çiçek E., Study on the potancially economical important species trawled from Karatas (Adana) coasts. Cukurova University PhD Thesis, 146 pp., 2006.
9. Çiçek E., Avşar D., Concurrency and distribution of Lessepsian fishes off Karatas coasts in 2002-2003 fishing season. International Symposium on Fisheries and Zoology (Ord. Prof. Dr. Curt KOSSWIG's 100th Anniversary), 24-26 October 2003, Istanbul, Turkey, 2003.
10. Erazi R.A.R., *Leiognathus mediterraneus* nov. Sp., Comptes Rendus des Turq et Science de Physique, 10, 49-53, 1943.
11. Ergüden D., Filiz H., Turan C., Revision in 2013 and gateway of Lessepsian fish species in Turkey's seas. XVI. Meeting on Underwater Science and Technology, 2-3 November 2013, Iskenderun, Turkey, 2013.
12. Fricke R., Bilecenoğlu M., Sarı H.M., Annotated checklist of fish and lamprey species (Gnathostomata and Petromyzontomorphi) of Turkey, including a Red List of threatened and declining species. Stuttgarter Beiträge zur Naturkunde Ser. A. 706, 169pp, 2007.
13. Golani D., Massutí E., Quignard J-P., Orsi-Relini L., CIESM Atlas of Exotic Species. Vol. 1- Fishes. Electronic publication, CIESM.
<http://www.ciesm.org/atlas/appendix1.html>, 01.07.2014, 2014.
14. Gücü A.C., Gücü G.M., Why Lessepsian immigrants are so successful in colonizing the defenders of the native ecosystem? Workshop on Lessepsian Migration Proceedings, 20-21 July 2002, Gokceada, Turkey, 75-82, 2002.
15. Gücü A.C., Bingel F., Avşar D., Uysal, N., Distribution and occurrence of Red Sea fishes at the Turkish Mediterranean coast-northern Cilician Basin. Acta Adriatica, 34, 103-113, 1994.
16. Halim Y., Morcos S.A., Rizkala S., El-Sayed M.K.H., The impact of the Nile and the Suez Canal on the living marine resources of the Egyptian Mediterranean waters (1958-1986), in Effects of riverine inputs on coastal ecosystems and fisheries resources. FAO Fisheries Technical Paper. No.349. FAO, Rome. 133pp, 1995.
17. Por F.D., Lessepsian Migration. The influx of Red Sea biota into the Mediterranean by way of Suez Canal, Ecological Studies: 23, Springer-Verlag, Berlin, 228p, 1978.
18. Tillier J.B., Le Canal de Suez et sa faune ichtyologique. Bulletin de la Société zoologique de France, 15, 279-318, 1902.
19. Watanabe Y., Zenitani H., Kimura R., Offshore expansion of spawning of the Japanese Sardine, *Sardinops melanostictus*, and its implication for egg and larval survival. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science, 53, 55-61, 1996.
20. Watanabe Y., Zenitani H., Kimura R., Variations in spawning ground area and egg density of the Japanese Sardine in Pacific coastal and oceanic waters. Fisheries Oceanography, 6, 35-40, 1997.

Received on 20.04.2015



Biol. Journal of Armenia, 4 (67), 2015

EFFECT OF CADMIUM IONS ON LIPID PEROXIDATION AND ACTIVITIES OF ANTIOXIDANT ENZYMES OF GROWING WHEAT (*Triticum aestivum* L.) SHOOTS

ZH.H. MUKHAELIAN, G.H. POGHOSYAN, P.H. VARDEVANYAN

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

The investigation of the effect of CdCl_2 different concentrations (20, 50, and 100 μM Cd) on growth of germs of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) has been carried out for 12 days. The influence of Cd^{2+} ions on lipid peroxidation and antioxidant system function of wheat shoots cells has been also studied. It has been shown that increasing Cd supply decreased shoots growth (fresh weight) and induced oxidative stress as was indicated by the enhancement of lipid peroxidation rate (MDA-level). Activities of antioxidant enzymes –catalase (CAT) and guaiacol peroxidase (GPX) also have been changed under Cd-stress; CAT activity was less affected and even lowered, in case when GPX activity was markedly increased. The role of plant age on formation of biosystem reaction was also discussed in present work. The very high peroxidase activity in wheat shoots, probably may be an important part of Cd-resistance machinery of wheat. The obtained results indicated that Cd-tolerance of wheat may be related with the activation of the antioxidant system to avoiding the toxicity of heavy metal.

Triticum aestivum L. – Cadmium – Antioxidant system – Shoots weight –
Catalase – Peroxidase – Plant age

Ուսումնասիրվել է CdCl_2 տարբեր կոնցենտրացիաների (20, 50, և 100 մկՄ Cd) ազդեցությունը ցորենի (*Triticum aestivum* L.) ծիլերի աճի, դրանցում լիպիդների պերօքսիդային օքսիդացման և հակաօքսիդանտային ֆերմենտների ակտիվության վրա: Ցույց է տրվել, որ Cd^{2+} առկայությամբ աճեցված բույսերի ծիլերի զանգվածը նվազում է, և աճում է լիպիդների պերօքսիդացման վերջնական արգասիքներից մեկի՝ մալոնային երկալդեհիդի (ՄԵՍ) քանակը: Cd^{2+} -ինդուկցված սթրեսը արտահայտվում է նաև կատալազի ակտիվության նվազմամբ և պերօքսիդազի ակտիվության նշանակալի աճով: Քննարկվում է բույսի տարիքային գործոնի հնարավոր դերը կենսահամակարգի պատասխան ռեակցիայի ձևավորման մեջ: Պերօքսիդազի ակտիվության աճը՝ ի պատասխան ծանր մետաղի ազդեցության, հավանաբար, վերջինիս նկատմամբ բույսի դիմադրության (Cd-ռեզիստենտության) մեխանիզմի կարևոր բաղադրիչը կարող է հանդիսանալ:

Triticum aestivum L. – կադմիում – հակաօքսիդանտային համակարգ –
ծիլերի զանգված – կատալազ – պերօքսիդազ – բույսի տարիք

Изучено влияние разных концентраций CdCl_2 (20, 50, и 100 мкМ) на рост, интенсивность процессов перекисного окисления липидов и функционирование антиоксидантной системы проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.). Установлено, что использованные концентрации кадмия ингибируют увеличение биомассы проростков, а также приводят к накоплению малонового диальдегида (МДА) в них. При этом активность

катализ в проростках в присутствии кадмия снижается, а активность пероксидазы значительно возрастает. Обсуждается вопрос возможной возрастной зависимости ответной реакции растения на воздействие ионов тяжелого металла. Высокая пероксидазная активность, вероятно, может быть частью механизма Cd-толерантности пшеницы.

Triticum aestivum L. – кадмий – антиоксидантная система – вес проростков –
катализа – пероксидаза – возраст растения

Abiotic stress is the main factor negatively affecting crop growth and productivity world-wide. Plants are continuously confronted with the harsh environmental conditions such as soil salinity, drought, heat, cold, flooding and heavy metal contamination [5, 9, 18, 25].

Cadmium (Cd) is one of the most toxic heavy metals with no biological function, which is commonly released into the arable soil from industrial processes and farming practices [9,20]. Cadmium is well known for its phytotoxicity, which is associated with number of morphological, physiological and biochemical events [2,4, 6, 20]. Being readily taken up by roots, probably in competition with other divalent ions, Cd restricts plant growth and development. It arrests the plant growth and thus affects the biomass [2,10,11].

Heavy metals cause damage to plant growth in many ways. One of the possible mechanisms is that heavy metals lead to the production of free radicals- reactive oxygen species (ROS) in plants [5,10]. Although the mechanism of metal damaging action is not clearly understood, there is increasing evidence suggesting that, at least in part, metal toxicity is due to the oxidative damage [5, 6, 7,10, 11].

Although a lot of reports regarding influence of Cd are available, to our knowledge the mechanisms high plants tolerance to heavy metal-stress remained yet not clearly understood.

Wheat (*Triticum aestivum L.*) is a crop plant of the Poaceae family. Increased cadmium uptake from contaminated soils leads to altered plant metabolism and limits the crop productivity. Keeping in view the importance of wheat as an important yield crop and the Cd-stress being faced by the crop, the present study was designed to test effects of Cd ions different concentrations on growth (weight), lipid peroxidation (MDA accumulation) and the activity of antioxidant enzymes CAT and guaiacol peroxidase GPX in growing wheat seedlings.

Materials and methods. Plant Culture and Treatment -The seeds of winter wheat (*Triticum aestivum L.*) of “Bezostaya” sort were surface sterilized with 0,03 % potassium permanganate (KMnO₄) solution, then moistened by water during 12 hours. These seeds were germinated on wet filter paper in Petri dishes at 25⁰ C in thermostat in the dark for 3 to 12 days. CdCl₂ treatment was performed in Petri dishes by once adding CdCl₂ solution at the concentrations 25, 50 and 100 μM. The etiolated shoots of 3-, 6- and 12 days-old plants both- control and Cd-treated were harvested and then subjected to biochemical analysis.

Extract preparation- The shoots (500mg) of both control and Cd-treated plants were harvested at respective time period and were homogenized in 5ml 25 mM cold phosphate buffer [pH 7,0, containing EDTA (1 mM), Triton X-100 (0,5 %)] in a mortar and pestle. All procedures were performed in cold conditions. The homogenate was centrifuged at 12.000g for 10 min at 4⁰ C to remove plant debris. The supernatant was used for assessing the protein content and GPX and CAT activities using UV-visible Spectrophotometer (model SF-46, USSR). All enzymatic activities were measured at 25⁰ C.

The method of Lowry [12] was followed to estimate protein content in the shoots using bovine serum albumin as a standard.

Analyses of lipid peroxidation- Lipid peroxidation in shoots was determined by estimation of the MDA content following the method of Costa H. [3] with slight modification. Shoots fresh samples (500 mg) were homogenized in 5 ml of 0,1% trichloroacetic acid (TCA). The homogenate was centrifuged at 10000g for 5 min. To every 1 ml of aliquot, 4 ml of 17% TCA containing 0,5 % thiobarbituric acid (TBA) was added. The mixture was heated at 95⁰ C for 20 min and then cooled quickly on ice bath. The resulting mixture was centrifuged at 10000 g for 15 min, and the absorbance of the supernatant was taken at 532 and 600 nm. The nonspecific absorbance at 600 nm was subtracted from the absorbance at 532 nm. The concentration of MDA was calculated using the extinction coefficient 156 mM⁻¹ cm⁻¹ and expressed as nmol/mg protein.

Catalase CAT (EC 1.11.1.6) activity – The method based on the reaction of the H_2O_2 in a mixture with ammonium molybdate $((\text{NH}_3)_2 \cdot \text{MoO}_4)$ proposed by Korolyuk M. [24] was used to estimate CAT activity. The change in optical density due to the emergence of complex H_2O_2 – ammonium molybdate is measured spectrophotometrically at 1-st and 10-th min at 410 nm. The assay mixture contained 1ml Tris-HCl (0,02M, pH 7,4) 2ml H_2O_2 (0,03 %), and 0,1 ml enzyme sample. This was incubated for 10 min at 25°C in dark, after which the reaction was stopped by adding 1ml of ammonium molybdate (4 %). To the blank 0,1 ml distilled water was added of the zero time of the same assay mixture. A decrease in the absorbance of H_2O_2 within 10 min at 410 nm ($E=22,2 \cdot 10^3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) was recorded.

The CAT activity was expressed in unit activity (UA). mg^{-1} protein. UA is defined as the change in absorbance by $1 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ protein.

Guaiacol peroxidase GPX (EC 1.11.1.7) activity was measured using the method of Hemeda H. [8]. Peroxidase activity was determined in guaiacol oxidation reaction by optical density changing measured of assay mixture every 20 s for 2 min at 25°C and 450 nm. The reaction started since the moment of injection of 1,0 ml 0,3% H_2O_2 solution into reaction mixture. The reaction mixture contained 1,5 ml of 50 mM potassium phosphate buffer [pH 6,6, containing 0,1mM EDTA], 1ml 1% guaiacol, and 1,0 ml of 0,3 % H_2O_2 and the 0,2 ml enzyme aliquot. Instead of enzyme aliquot 0,2 ml distilled water was add into control sample. The enzyme activity was measured by the increase of absorbance at 450 nm caused by guaiacol oxidation ($E=26,6 \cdot 10^3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

All the experiments were performed in triplicates and values presented here are the mean of three values $\pm$ standard error.

Results and Discussion. *Triticum aestivum* L. plants response reaction to Cd-stress was determined based on lipid peroxidation system activity changes in germ cells and seedlings biomass. It has been shown that Cd-treatment effects on mass change of germinated seed shoots during their growth.

Effects of CdCl_2 supplement on growth of wheat's shoots were carried on samples of 3-, 6-, and 12-days-old plants. Cadmium treatment did not cause visible leaf chlorosis in wheat shoots and also did not cause significant changes in amount of shoots mass (fig. 1) for all – 3, 6- and 12-day-old plants.

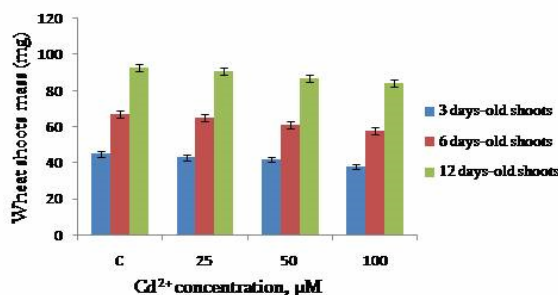


Fig. 1. The mass change of wheat germ shoots treated by CdCl_2 solution during their growth

As it is obvious from represented data (fig. 1), among experimental 3-days-old seedlings mass maximum inhibition- 16% was noticed at $100 \mu\text{M}$ Cd, when $50 \mu\text{M}$ concentration results by 4,5% mass decrease as compared with untreated plants. Similar was the case with 6-days –old plants, grown under Cd metal stress. Their shoots mass was decreased by 9 % and 15 % respectively for supplemented Cd concentrations as compared with control plants of the same age. Besides, the inhibition of seedlings growth intensity shows clear concentration dependence on the amount of the metal ions existing in the environment (fig. 1). According to the obtained data Cd toxicity induces

decreased shoot mass in all seedlings, but in the course of time (6-12 days-old shoots) the growth intensity showed trend for slight increasing.

Reduced shoots length and weight in winter wheat (*Triticum aestivum* L.) and canola (*Brassica napus* L.) plants subjected to cadmium metal toxicity have been reported [10,11,13, 16, 23]. Similar was the observation in lead-stressed wheat seedlings, in which metal application led to an increase in activities of SOD, CAT, APX and MDA in seedling extracts at different concentrations of metall [10, 11].

Malondialdehyde (MDA) level is widely used as the indicator of lipid peroxidation. From the data represented in fig. 2 it is obvious that in untreated seedlings MDA amount changes according to the age of shoots. Thus, approximately the same MDA value was recorded in 3- and 6-days-old shoots. In the case of 12-days-old shoots, MDA level was decreased at 35 % compared to the same parameter in 3-days-old plants.

Obtained data shown, that Cd-treatment results by increase lipid peroxidation process activity, which expressed by MDA content increasing.

So, in cells of 3-days-old shoots growing under 25 μM . and 50 μM . Cd-treatment the MDA amount increases by 1,75- and 1,5 times as compared to control plants. At the same time, in the shoots of 3-days-old plants subjected to 100 μM Cd increasing of MDA amount is not observed, which witnessed that lipid peroxidation intensity does not exceed the appropriate control (fig. 2).

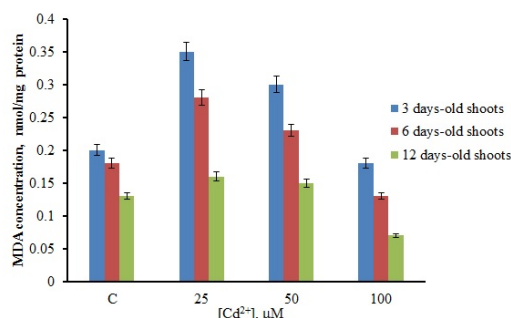


Fig. 2. Effect of Cd treatment on the level of MDA in the shoots of wheat

As it is presented from fig. 2 Cd- treated 6-days-old shoots also demonstrate high level of MDA, but which was lower, than that of 3-days-old shoots. Thus, at presence of 25 μM . and 50 μM CdCl₂ in growing environment the MDA level in these shoots increased by 1, 55- and 1, 27- times respectively as compared with control. In the same age shoots grown under 100 μM Cd stress MDA amount was $0,13 \pm 0,021\text{nmol/mg}$ protein, which was lower than the rate of the respective control.

Comparing obtained results of MDA level and catalase activity in Cd-stressed plant shoots, we can notice that the comparatively high level of MDA in the shoots being in early phase of their growth is correlated to the suppression of catalase activity in the shoots of the same age. In the course of time (6-12 days), data about the increase of the catalase activity correspond well to slowdown of MDA level in the shoots of the same age.

Our obtained data on the increase of lipid peroxidation measured by enhanced Cd supply is in good correlation with data [2, 13, 16].

It was found, that in untreated plants catalase activity was grown according to their age, and in 12-days-old shoots it was for 1,72- times higher than in 3-days-old shoots (fig. 3). The presence of 25 μM of cadmium in the environment causes 28% decrease of catalase activity in 3-days-old wheat shoots compared to the control. The further increase of cadmium amount in the environment of growth up to 100 μM , causes

decrease in enzyme activity for more than three times compared to the control shoots of the same age (fig. 3). Parallel to the increase in supplemented cadmium concentration, enzyme activity decreases in the tested wheat shoots of the same age. At the same time, the catalase activity showed trend for increasing for each Cd concentration, according to the age of the shoots.

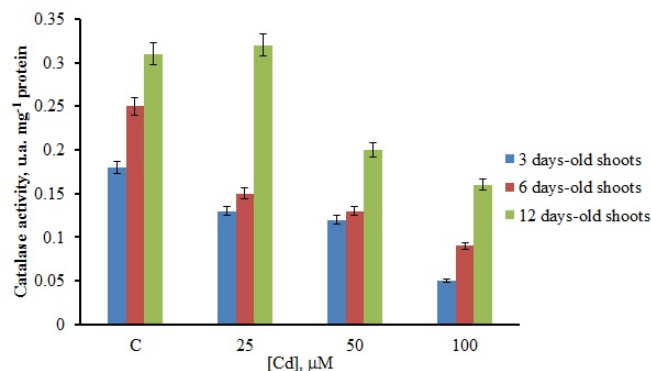


Fig. 3. Effect of Cd treatment on the catalase activity of wheat shoots

GPX activity was found to increase at all Cd concentrations and exposure durations.

As shown in fig. 4, upon Cd expose, there were significant changes in GPX activity in examined seedlings, compare with control. Activity of GPX in 3- and 12-days-old shoots was found to increase at 25 μM Cd, which was by 1,43- and 2,53- times higher than in control, respectively. In the wheat shoots grown in the presence of 50 μM and 100 μM of cadmium, too, GPX activity increases compared to control, however, the highest activity was registered in 6-days-old shoots. As a result of analyzing the given data, we can conclude that with the growing age of the wheat shoots the activity of GXP increases. Moreover, with the increase of shoots age, the maximum amount of enzyme transfers to the sector of the lower concentrations of cadmium. The high activities of GPX appear to be involved in effective scavenging ROS generated by Cd treatments.

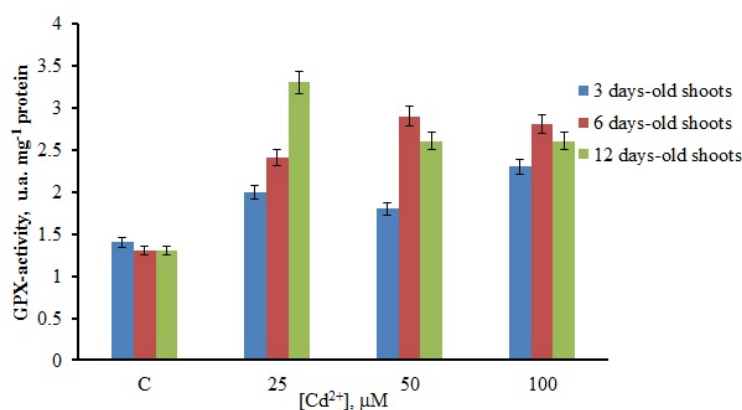


Fig. 4. Effect of Cd-treatment on the GPX gualcol peroxidase activity of wheat.

In plants submitted to metal stress, CAT and GPX act as a defense mechanism which gets activated [2, 13]. The response of antioxidant enzymes differed to Cd-stress in wheat seedlings. Thus GPX activity was distinctly high at all Cd concentrations, whereas CAT activity was decreased (fig. 3, 4). Increase in activities of antioxidant enzymes *viz.* catalase and guaiacol-peroxidase under Cd-stress in present study is consistent with the studies [2, 10, 16] in which seeds *Triticum aestivum* L. were grown under CdCl₂ stress and antioxidative enzymes activities were found to increase in 3-7-days old shoots.

Similar results are registered in work by Kolesnichenko V. [23] in etiolated wheat and barley 7-14-days-old shoots at high Cd concentrations.

There is little information in literature concerning the relationship between plant's age and its Cd- tolerance. Now it is known that the capability of plants to accumulate cadmium can be changed during the ontogenesis [19, 21]. Particularly, the examination of age effects of cadmium accumulation and its distribution according to plant organs made on barley shoots has made it clear that in more mature plants, the amount of cadmium passing from the root to the stem decreases on account of the intensification of barrier function [21, 22]. Probably, this can explain the obvious decrease of MDA accumulation in wheat shoots related to the plant age.

The decrease of the wheat seedlings biomass, increase in MDA amount and in CAT and GPX activity under cadmium stress in present investigation signifies the toxic effects of this heavy metal. Differences of wheat shoots response to the influence of cadmium can be related to the ontogenetic difference of resistance to the heavy metal, as well as to non-uniform effectiveness of adaptation mechanisms of plants being in different phases of development.

REFERENCES

1. Ahmad J., Neem M., Khan N., Samullah G. Effects of cadmium stress upon activities of antioxidative enzymes, photosynthetic rate, and production of phytochelatin in leaves and chloroplasts of wheat cultivars differing in yield plants. *Photosynthetica*, 47, 1, 146-151, 2009.
2. Amirajani M.R. Effects of Cadmium on wheat growth and some physiological factors, *Inter. J. of Forest, Soil and Erosion*, 2, 1, 50-58, 2012.
3. Costa H., Gallego S.M., Tomaro M.L. Effect of UV-B radiation on antioxidant defense system in sunflower cotyledons, *Plant Science*, 162, 6, 939-945, 2002.
4. DarSorso G., Farinati S., Furnim A. Regulatory network of cadmium stress in plants. *Plant Signal Behav.*, 5, 663-667. [PMC free article][Pub Med], 2010.
5. Gill S. S., Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant mechinery in abiotic stress tolerance in crop plants, *Plant Physiol. Biochem.*, 48, 909-930, [PubMed] 2010.
6. Gill S.S., Tuteja N. Cadmium stress tolerance in crop plants: Probing the role of sulfur, *Plant Signal. Behav.*, 6, 2, 215-222, 2011.
7. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3-rd ed. Oxford University press, New York, NY, USA, 1999.
8. Hemeda H.M., Klein B.P. Effect of naturally occurring antioxidants on peroxidase activity of vegetable extracts. *J. Food Sci.*, 55, 184-185, 1990.
9. Irfan M., Hayat S. H., Alyemeni M. Soil cadmium enrichment: Allocation and plant physiological manifestations. *Saudi J. Biol. Sci.*, 20, 1, 1-10, 2013.
10. Khan N.A., Singh S.S., Nazar R. Activities of antioxidative enzymes, sulphur assimilation, photosynthetic activity and growth of wheat (*Triticum aestivum*) cultivars differing in yield potential under cadmium stress. *J. Agro Crop Sci.*, 193, 435-444, 2007.
11. Lamhamdi M., Bakrim A., Arab A., Lafont R., Sayah F. Lead phytotoxicity on wheat (*Triticum aestivum* L.) seed germination and seedlings growth., *CR Biol.*, 334, 118-126 [PubMed], 2011.

12. Lowry O.H., Reserbrough N.J., Farr S.L., Rondall R.L. Protein measurement with Folin phenol reagent, J. Biol. Chem., 193, 265-75, 1951.
13. Milone M.T., Sgherri C., Clijsters H., Navazi Antioxidative respons of wheat treated with realistic concentration of cadmium, Envir. Exp. Bot, 50, 265-176, 2003.
14. Mohamed A.A., Costagna A., Ranieria A., Sanita di Toppi L. Cadmium tolerance in *Brassica juncea* roots phytochelatin biosynthesis, Plant Pysiol Biochem., 57, 15-22 [PubMed], 2012.
15. Noctor G., Foyer C.H. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. Ann Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 49, 249-279 [PubMed], 1998.
16. Poghosyan G., Mukhaelyan Zh., Vardevanyan P. Influence of cadmium ions on growth and antioxidant system activiry of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings, Int. J of Sci. Res. In Envir. Sci., 2, 10, 371-378, 2013.
17. Sharma N., Hundal G., Sharma I., Bhardwaj R. 28-Homobrassinolide alters protein content and activities of glutathione-S-transferase and polyphenol oxidase in *Raphanus Sativus* L. plants under heavy metal stress, Toxicol. Int., 21, 1, 44-50, 2014.
18. Solanki P., Dhankhar R. Biochemical changes and adaptive strategies of plants under heavy metal stress Biologia, 66, 195-204, 2011.
19. Vassiliev A. Tsonev T., Yordanov I. Physiological response of barley plants (*Hordeum vulgare* L.) to cadmium contamination in soil during ontogenesis, Environ. Pollut.103, 289-197, 1998.
20. Wahid A., Azshad M., Faroog M. Cadmium phytotoxicity: Responses, mechanisms and mitigation strategies: a reviw: Sus, Agric. Rev, 1, 371-403, 2009.
21. Батова Ю.В., Титов А.Ф., Казнина Н.М., Лайдинен Г.Ф. Накопление кадмия по органам у растений ячменя разного возраста. Труды Карельского НЦ РАН, 2, 32-37, 2012.
22. Казнина Н.М., Титов А.Ф., Лейдинен Г.Ф., Батова Ю.В. Влияние кадмия на некоторые физиологические показатели растений ячменя в зависимости от их возраста, Труды Карельского НЦ РАН, 2, с.27-31, 2010.
23. Колесниченко В.В. Изучение влияния разных концентраций кадмия на этиолированные проростки пшеницы (*Triticum aestivum* L.) и рапса (*Brassica napus*), Journal of Stress Physiology & Biochemistry, 5, 1-2, pp. 16-31, 2009.
24. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы, Лабораторное дело, 1, с.16-19, 1988.
25. Титов А.Ф., Таланова В.В., Казнина Н.М., Лайдинен Г.Ф. Устойчивость растений к тяжелым металлам, Петрозаводск: Карельский НЦ РАН, 170 с., 2007.

Received on 15.07.2015



Биол. журн. Армении, 4 (67), 2015

ВЛИЯНИЕ РЕЗЕКЦИИ ПЕЧЕНИ НА АЗОТИСТЫЙ МЕТАБОЛИЗМ В СЕЛЕЗЁНКЕ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ТЕТРАХЛОРМЕТАНОВОМ ГЕПАТИТЕ

П.Н. САВИЛОВ

ТОГБУЗ “Тамбовская ЦРБ”, с. П.Пригородное, Россия
Воронежский государственный медицинский университет, Воронеж, Россия
p_savilov@rambler.ru

В опытах на 85 крысах самках 180-220 г исследовали влияние резекции печени (РП, 15% от массы органа) на азотистый метаболизм в селезёнке животных с хроническим тетра-хлорметановым гепатитом (CCl_4 , 50% раствора CCl_4 на оливковом масле (0,1 мл /100 г мас-сы) через сутки с двумя двухнедельными перерывами между 6-7- и 13-14 инъекциями). Ис-следованиями установлено, что РП усиливает нарушения азотистого метаболизма в селезён-ке, возникающие в процессе развития хронического CCl_4 -гепатита. Это проявляется патоло-гическим накоплением в ней аммиака и глутамина спленоцитами при истощении внутрикле-точных реакций его связывания. Стимуляция образования спленоцитами мочевины на 3-и и 7-е сутки послеоперационного периода прекращается к 14-м сут после РП и сопровождается снижением концентрации мочевины в спленоцитах, несмотря на её повышенное поступ-ление к ним с артериальной кровью

Резекция печени – гепатит – селезёнка – аммиак – обмен

180-220 գ քաշով 85 էգ առնետների վրա կատարված փորձերում հետազոտվել է լյարդի ռեզեկցիան (ԼՐ, օրգանի զանգվածի 15%) քրոնիկ տետրաքլորմեթան հեպատիտով (CCl_4 , CCl_4 -ի 50 %-անոց լուծույթ ձիթապտղի յուղով (0,1 մլ/100 գ զանգվածի վրա) կենդանիների փայծաղում ազոտի նյութափոխանակության վրա՝ օրը մեջ. երկշաբաթական ընդմիջումներով 6-7 և 13-14 ներար-կումների միջև: Հետազոտությունները հաստատեցին, որ ԼՐ ուժեղացնում է փայծաղում ազոտի նյութափոխանակության խախտումները, որոնք առաջանում են քրոնիկ CCl_4 -ի հեպատիտի զարգացման արդյունքում: Այն արտահայտվում է իր մեջ ամոնիակի և գլուտամինի պաթոլոգիկ կուտակմամբ՝ սպլենոցիտներով կապման ներբջջային ռեակցիաների հյուսվածքում ընթացքում: Միզանյութի ձևավորման խթանումը սպլենոցիտներով հետվիրահատական շրջանի 3-րդ և 4-րդ օրերին դադարեցվում է ԼՐ-ից հետո 14-րդ օրը և ուղեկցվում է սպլենոցիտներում միզանյութի խտության նվազմամբ՝ անկախ վերջինիս ավելացող մուտքից դրանց մոտ զարկերակային արյան հետ:

Լյարդի ռեզեկցիա – հեպատիտ – փայծաղ – ամոնիակ – նյութափոխանակության

The influence of liver resection (LR, 15-20 % ,by weight of the organ) on nitrogen metabolism in the spleen of animals with chronic tetrachlorcarbon hepatitis was investigated. It was shown that LR disorders of nitrogen metabolism in the spleen arising the process of develop-ment of chronic CCl_4 -hepatitis. This is manifested by abnormal accumulation of ammonia and glu-

tamine by splenocyte during the depletion on its intracellular binding reactions. Stimulation of urea formation by splenocyte on the 3rd and 7th day of the postoperative period was interrupted on 14 days after LR and is accompanied by a decrease in urea concentration in splenocyte, in spite of their increased entrance with arterial blood.

Spleen – ammonium – glutamine – urea – hepatitis – liver resection

В процессе развития хронического гепатита не только нарушается обезвреживание аммиака в гепатоцитах [9], но и азотистый метаболизм в спленоцитах [15], принимающих активное участие в повреждении печени после прекращения действия на него патогенного агента [22]. Одним из способов хирургического лечения хронических гепатитов и циррозов печени является резекция печени (РП) [7]. Её применение основано на стимуляции репаративных процессов в поражённом органе и запуске резорбции избытка соединительной ткани, образующейся при данной патологии [18]. Между тем известно, что РП на фоне хронического гепатита усиливает развивающиеся при данной патологии [4] нарушения аммиако-безвреживающей способности гепатоцитов [8]. В результате прогрессирует эндогенная аммиачная интоксикация [11], однако состояние азотистого метаболизма в спленоцитах после РП на фоне хронического гепатита не исследовано.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния РП на азотистый метаболизм спленоцитов при хроническом тетрахлорметановом гепатите.

Материал и методика. Опыты проведены на 85 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) [16]. РП осуществляли путём удаления части левой доли печени (15 % -20 % от массы органа) под эфирным наркозом на 65-е сут развития CCl_4 -гепатита сразу после последней инъекции токсина. Животные были разделены на 5 серий опытов: 1 – интактные животные (норма), 2 – животные, исследованные на 65-е сутки введения CCl_4 (конец затравки), 3, 4, 5 – животные с хроническим CCl_4 -гепатитом, исследованные, соответственно, на 3-и, 7-е и 14-е сут после лапаротомии и отмены CCl_4 . Эти серии служили контролем для выявления “чистого” эффекта РП. 6,7 и 8 серии- животные с хроническим CCl_4 -гепатитом, исследованные, соответственно, на 3-и, 7-е и 14-е сутки после РП. Забой животных проводился на фоне этилового наркоза (40 мг этилового Na /кг массы). Для определения азотистых метаболитов селезёнку замораживали в жидком азоте и растирали до порошка, который использовали для приготовления 10% гомогената в 60%-ном растворе трихлоруксусной кислоты. Гомогенат экстрагировали на холоде в течение 30 мин, затем его 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 [17], в крови – фенилгипохлоридным методом [21]. Содержание глутамина в почках и крови определяли методом кислотного гидролиза [20]. Содержание мочевины в селезёнке и крови – диацетилмоноксидным методом [23]. Содержание метаболитов в селезёнке выражали в ммоль/кг влажной ткани, в крови – в ммоль/л. Результаты обработаны статистически с применением t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Как видно из табл.1, на 65-е сут после РП концентрация аммиака в АК в конце затравки превышала норму на 90%. Это указывает на то, что РП у животных с хроническим CCl_4 -гепатитом проводилась на фоне развития артериальной гипераммониемии. На 3-и сут после РП концентрация аммиака в АК увеличивалась на 14% по сравнению с концом затравки, на 7-е сут не отличалась от неё, а на 14-е сут снижалась на 14% (табл.1). Однако по сравнению с нормой она оставалась достоверно повышенной во все дни наблюдений (табл.1).

Таблица 1. Содержание азотистых метаболитов в селезёнке (ммоль/кг влажной ткани) и артериальной крови (ммоль/л) после резекции печени на фоне хронического CCl₄-гепатита, $M \pm m$

Метаболиты	Норма, n=15	65-сут введения CCl ₄ , конец заправки, n=10	Сутки после резекции печени		
			3 (n=10)	7 (n=10)	14 (n=10)
Селезёнка					
Аммиак	1,67 ± 0,12	2,91±0,15*	3,23±0,11 [▲] *	2,09±0,18	5,1±0,55*
Глутамин	2,17 ± 0,13	1,99±0,23	3,66 ± 0,39* [▲]	2,12±0,17	3,35±0,36* [▲]
Мочевина	3,31 ± 0,16	3,96±0,25	6,75±0,33* [▲]	8,06± 0,43* [▲]	4,94±0,51* [▲]
Артериальная кровь					
Аммиак	0,098±0,006	0,186±0,008*	0,212±0,01* [▲]	0,186±0,019*	0,160±0,01* [▲]
Глутамин	0,710±0,021	0,585±0,023*	0,691±0,019 [▲]	0,735±0,03 [▲]	0,815±0,034* [▲]
Мочевина	3,4 ± 0,12	7,11±0,36*	5,48±0,2* [▲]	6,82±0,41*	6,78±0,43*

* (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

Относительно “ложнооперированных” животных увеличение концентрации аммиака в АК на 3-и, 7-е и 14 сут после РП составило соответственно 27 %, 28 % и 25 % (рис.1). Если учесть, что повышенная концентрация аммиака в АК сохраняется в течение 14 сут после прекращения 65-дневного воздействия на организм малыми дозами CCl₄ [13], то можно говорить о синергизме влияния РП и CCl₄ на развитие артериальной гипераммониемии. Причиной тому не только прогрессирующее нарушение обезвреживания аммиака в печени, выявленное после её резекции на фоне гепатита [8], но и нарушение аммиакэксcretирующей функции почек оперированного организма [5].

Если у здоровых животных с РП послеоперационная артериальная гипераммониемия не сопровождалась накоплением аммиака в селезёнке [14], то длительное действие на организм CCl₄ вызывало увеличение его концентрации в спленоцитах, которое не нормализовалось к 14-м сут после отмены токсина [15]. РП на фоне хронического CCl₄-гепатита оказывала неоднозначное влияние на содержание аммиака в селезёнке. Если относительно конца затравки, достоверное (на 92 %) увеличение концентрации аммиака в селезёнке отмечено только на 14-е сут после РП, то по сравнению с нормой её увеличение наблюдалось 3-и и 14-е сут, соответственно на 93 % и 265 % (табл.1). Это по срокам совпадало с непосредственным стимулирующим влиянием РП на накопление спленоцитами аммиака (рис.1, А, В). Между тем на 7-е сут после РП обнаружено отсроченное ингибирующее влияние РП на накопление аммиака спленоцитами (рис.1, Б), в результате чего происходила кратковременная нормализация его концентрации в селезёнке (табл.1). Сопоставление полученных результатов указывает на то, что РП на фоне хронического CCl₄ –гепатита усугубляет нарушения азотистого метаболизма в спленоцитах, вызванные длительным действием на организм CCl₄, что проявляется активацией в них аммиониогенеза в раннем (3-и сут) и позднем (14 сут) послеоперационном периоде. В пользу этого указывает несоответствие прироста концентрации аммиака в АК и селезёнке, выявленное в указанные сроки исследования (рис.1, А,В). Что касается нормализации содержания аммиака в селезёнке на фоне артериальной гипераммониемии (7-е сут), есть все основания говорить о сопряженной с РП активации в указанный период реакций нейтрализации аммиака в спленоцитах, благодаря чему его концентрация в них снижается, несмотря на увеличение его поступления к ним с АК.

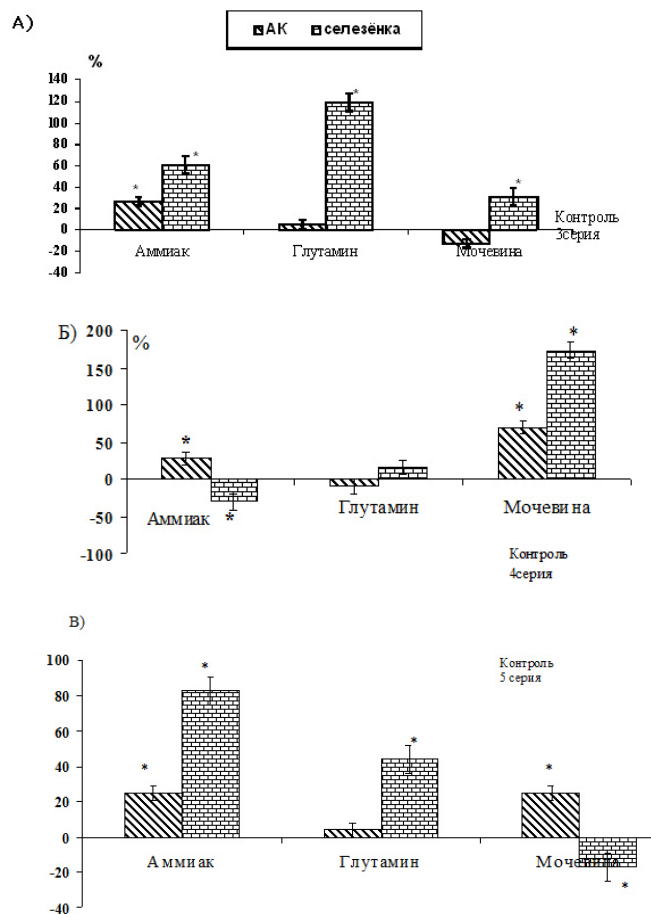


Рис.1. Динамика содержания азотистых метаболитов в селезёнке животных с хроническим CCl_4 -гепатитом на 3-и (А), 7-е (Б) и 14-е (В) сут после резекции печени.

* ($p < 0,05$) – достоверность различий по сравнению с соответствующим контролем.

Контроль □ “ложнооперированные” животные с хроническим CCl_4 -гепатитом, исследованные соответственно на 3-и (3 серия), 7-е (4 серия) и 14-е (5 серия) сут после отмены CCl_4 и лапаротомии. В сериях опытов □ по 10 животных.

Внутриклеточное содержание аммиака определяется не только соотношением метаболических реакций его образования и связывания, но и скоростью обмена аммиака между клеткой и окружающей средой [3]. Важная роль в кинетике аммиака отводится состоянию органного или тканевого кровотока [24]. Что касается селезёнки, то особенностью её гемодинамики является зависимость от давления в воротной вене [6]. В настоящее время установлено, что после резекции здоровой печени [25], как и при её хроническом диффузном поражении [16] происходит развитие портальной гипертензии. Поэтому есть все основания ожидать её прогрессирования после РП на фоне хронического CCl_4 -гепатита и как следствие нарушение оттока крови из селезёнки, которое будет содействовать накоплению в ней аммиака, особенно на 14-е сут послеоперационного периода. Портальную гипертензию можно рассматривать как одну из причин накопления селезёнкой глутамина, обнаруженного на 3-и и 14-сут после РП на фоне отсутствия в указанные сроки увеличения его содержания в АК (рис. А,В).

Глутамин не только является обратимой формой связывания аммиака в клетках млекопитающих [3], но и транспортной формой глутамата, который, как известно [2], плохо проходит через плазматическую мембрану. В клетке глутамин подвергается дезамидированию при участии глутаминаз, в результате чего высвобождается глутамат и аммиак [3]. Глутамат прямо и опосредованно вовлекается в многочисленные биохимические реакции, тогда как аммиак либо выводится из клетки, либо нейтрализуется в ней с образованием “собственного” глутамина при участии глутаминсинтетазы [3].

В организме млекопитающих одним из основных органов, определяющих концентрацию глутамина в АК, является печень [12]. РП усиливает нарушение глутаминообразовательной функции гепатоцитов, вызванное поражением печени CCl_4 [8]. Если прибавить к этому снижение инкреции глутамина из оперированной печени в кровоток [10], то вправе ожидать развития после резекции поражённой CCl_4 печени артериальной гипоглутаминемии. Однако как показали наши исследования (табл.), в этом случае наблюдается постепенное восстановление сниженной перед операцией концентрации глутамина в АК с отсроченным развитием на 14-е сут послеоперационного периода артериальной гиперглутаминемии. При этом, в отличие от влияния на концентрацию аммиака, непосредственного влияния на изменение концентрации глутамина в АК резекция печени не оказывала (рис.). Следовательно, устранение артериальной гипоглутаминемии после РП на фоне хронического CCl_4 -гепатита обусловлено исключительно прекращением действия гепатотоксина, а не запуском адаптивных внепечёночных механизмов глутаминообразования, обнаруженного у здоровых животных после РП [12].

В отличие от АК, на 3-и и 14-е сут после РП отмечено увеличение концентрации глутамина в селезёнке относительно “ложнооперированных” животных контрольных серий опытов, соответственно на 119 % и 43 % (рис. А,В). В результате она становилась достоверно выше соответствующего показателя нормы и конца затравки (табл.). Между тем, сопоставление полученных результатов, с данными литературы [14, 15] позволяет говорить о разных механизмах, лежащих в основе накопления глутамина спленоцитами на 3-и и 14-е сут после РП на фоне хронического CCl_4 -гепатита. В первом случае следует говорить о стимуляции образования глутамина спленоцитами, тогда как во втором речь должна идти о преимущественном накоплении ими “артериального” глутамина на фоне торможения образования “селезёночного” глутамина. Неслучайно столь выраженное накопление в этот период спленоцитами аммиака происходит на фоне снижения степени артериальной гипераммониемии и отсроченного развития артериальной гиперглутаминемии (табл. 1). Что касается кратковременной нормализации содержания глутамина и аммиака в селезёнке на 7-е сут после РП у животных с хроническим CCl_4 -гепатитом, то это можно объяснить стимуляцией образования глутамина спленоцитами и его инкрецией в портальный кровоток. В свою очередь несоответствие прироста содержания аммиака в АК и селезёнке (рис. 1, А), выявленные на 3-и сут после РП на фоне отсутствия артериальной гиперглутаминемии (табл. 1) свидетельствует об активации в данный период дезаминирования в спленоцитах не глутамина, а других аминокислот.

Как видно из рис. 1 А, содержание мочевины в АК на 3-и сут после РП на фоне хронического CCl_4 -гепатита достоверно не отличалось от аналогичного показателя “ложнооперированных” крыс контрольной серии опытов. Однако на 7-е и 14-е сут оно превышало её, соответственно на 64 % и 25 % (рис. Б,В). По сравнению с нормой концентрация мочевины в АК была увеличена на 3-и, 7-е и 14-е сут послеоперационного периода, соответственно на 61 %, 100 % и 99 %, тогда как относительно конца затравки она снижалась на 23 % к 3-м сут послеоперационного

периода и в дальнейшем возвращаясь к предоперационному уровню (табл.1). Поскольку РП на фоне хронического гепатита нарушает мочевинообразование в печени [8], то выявленные изменения следует рассматривать как результат запуска внепечёночных механизмов, детерминирующих изменение концентрации мочевины в АК. Одним из них может служить увеличение её реабсорбции в почках, обнаруженное в указанные сроки послеоперационного периода у животных с РП на фоне хронического CCl_4 -гепатита [4].

Отсутствие изменения концентрации мочевины в АК на 3-и сут после РП у животных с хроническим CCl_4 -гепатитом сопровождалось увеличением на 30 % её содержания в селезёнке (рис.1, А). На 7-е сут исследования увеличение концентрации мочевины в последней составило 173 %, при этом прирост концентрации метаболита в селезёнке превосходил аналогичные её изменения в АК (рис.1, Б). На 14-е сут после РП на фоне сохранения стимулирующего влияния операции на увеличение концентрации мочевины в АК происходило её снижение на 17% в спленоцитах (рис.1, В). Полученные результаты указывают на различные механизмы, детерминирующие кинетику мочевины в селезёнке после резекции поражённой CCl_4 печени. Так, накопление мочевины в селезёнке на 3-и сут после РП следует рассматривать как результат стимуляции её образования спленоцитами, поскольку установлено стимулирующее влияние РП на активность в спленоцитах аргиназы [19], катализирующей образование мочевины из аргинина. Данный биологический эффект, видимо, сохраняется на 7-е сут послеоперационного периода, несмотря на увеличение в этот период поступления в спленоциты мочевины с АК (рис.1, В). Однако на 14-е сут послеоперационного периода стимулирующее влияние РП на активность аргиназы спленоцитов прекращается. Можно предположить, что одновременно с этим в спленоцитах активируется переход части “артериальной” мочевины из свободного в связанное состояние, что является одним из универсальных механизмов адаптации организма при патологии, сопровождающейся активацией ПОЛ [1]. Этим, на наш взгляд, и объясняется снижение концентрации мочевины в селезёнке на фоне её повышенной концентрации в АК (рис.1, В).

Таким образом, применение РП на фоне хронического CCl_4 -гепатита вызывает дальнейшие нарушения азотистого метаболизма в спленоцитах, обусловленные длительным действием на организм гепатотоксина. Это сопровождается патологическим накоплением селезёнкой эндогенного токсина аммиака на фоне истощения в них внутриклеточных реакций его связывания, в том числе через образование “селезёночного” глутамина. По мере развития послеоперационного периода стимулирующее влияние РП на накопление мочевины прекращается и происходит снижение её содержания в спленоцитах, несмотря на сохранение её повышенного поступления к ним с АК.

Считаю своим долгом выразить глубокую признательность моему учителю профессору кафедры нормальной физиологии Воронежского государственного медицинского университета им. Н.Н. Бурденко Виктору Николаевичу Яковлеву за возможность проведения исследований в его лаборатории с 1997 по 2003 г.г. и ценные советы при обсуждении полученных результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гершенович З.С., Кричевская А.А., Лукаш А.И. Мочевина в живых организмах. Ростов н/Д, РГУ, 1970

2. *Западнюк В.И., Купраш Л.Г., Заика М.У. Безверхая И.С.* Аминокислоты в медицине Киев,Здоров'я,1982.
3. *Косенко Е.А., Каминский Ю.Г.* Клеточные механизмы токсичности аммиака. М., Изд-во ЛКИ, 2008.
4. *Молчанов Д.В.* Кинетика азотистых метаболитов в почках при частичной гепатэктомии, хроническом гепатите и гипербарической оксигенации. Дисс. канд мед наук, ВГМА Воронеж, 2010.
5. *Молчанов Д.В., Савилов П.Н.* Почечные механизмы элиминации аммиака при резекции печени (экспериментальное исследование). Российский вестник детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии, 3, 3,64-68, 2013.
6. *Пациора М.Д.* Хирургическое лечение портальной гипертензии. М.:Медицина, 1974.
7. *Пышкин С.А., Малышев Ю.И., Димов П.Г.* Показания к хирургическому лечению хронического гепатита и цирроза печени. Клиническая хирургия, 9, 29-32,1986
8. *Савилов П.Н., В.Н. Яковлев В.Н., Леонов А.Н.* Роль гипербарической оксигенации в механизмах детоксикации аммиака при резекции печени на фоне хронического гепатита. Анестезиология и реаниматология, 6, 31-34, 1994.
9. *Савилов П.Н.* Состояние аммиакобезвреживающей функции печени при хроническом активном гепатите. Патол. физиол. и эксперим. терапия, 1, 24-26, 2004.
10. *Савилов П.Н.* Глутаминовый цикл печени после её резекции. Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии, 7, 53-58, 2010.
11. *Савилов П.Н., Молчанов Д.В.* Кинетика аммиака в организме при хроническом гепатите частичной гепатэктомии и гипербарической оксигенации. Журнал теоретической и практической медицины Воронеж, 8, 2, 211-216, 2010.
12. *Савилов П.Н., Молчанов Д.В., Яковлев В.Н.* Влияние гипербарической оксигенации на кинетику глутамина в организме при печёночной недостаточности Общая реаниматология 8, 2, 20-27, 2012.
13. *Савилов П.Н., Молчанов Д.В.* Кинетика азотистых метаболитов в почках при хроническом тетрахлорметановом гепатите. Патологическая физиология и экспериментальная терапия, 2, 56-60, 2014
14. *Савилов П.Н.* Азотистый метаболизм селезёнки при резекции печени и гипербарической оксигенации. Биологический журнал Армении, 66,2, 6-17, 2014.
15. *Савилов П.Н.* Азотистый метаболизм в селезёнке при хроническом тетрахлорметановом гепатите. Биолог. журн. Армении, 67, 2, 36-41, 2015.
16. *Саркисов Д.С., Рубецкой Л.С.* Пути восстановления цирротически изменённой печени М., Медицина.1965
17. *Силакова А.И., Трубин Г.П., Явликова А.И.* Микрометод определения аммиака и глутамина в тканевых трихлоруксусных экстрактах. Вопросы медицинской химии, 8, 5, 538-544, 1962.
18. *Солопаев Б.П.* Регенерация нормальной и патологически изменённой печени. Горький: Верхне-Волжск. Изд-во,1980.
19. *Чернышнёва М.Д., Малыгин А.М., Фель В.Я.* Индукция аргиназной активности в спленоцитах мышей СЗНА при частичной гепатэктомии. Цитология, 27, 2, 209-212, 1985.
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. *Keller H., Muller-Beisenritz, M., Neumann E.* Eine Methode zur Ammoniakbestimmung in Capillarblut Klin. Wsch.,15, 314-319, 1967.
22. *Pincard R.N., Weir D.M.* Antibodies against mitochondrial fraction of lever after toxic liver damage rats Clin.Exper. Immunol., 1, 33-43, 1966.
23. *Richterrich D.* Clinical. Chemistry -N.Y.: Academia Press, 1962.
24. *Savilov P.N., Yakovlev V.N.* Hyperbaric oxygenation and partial hepatectomy effects on liver bloodstream, oxygen pressure and ammonia detoxication in the liver under chronic hepatitis. Jugosl. Physiol. Pharmacol. Acta, 42, 32,103-114, 2006.
25. *Ungvary J., Bars T, Hunda P.A.* Regeneration of the hepatic arterial system after partial hepatectomy. Acta. Morf. Hung,23, 3-4, 275-282, 1977.

Поступила 03.09.2015



Биолог. журн. Армении, 4 (67), 2015

АНАЛИЗ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК У ЯЩЕРИЦ *DAREVSKIA RADDEI*, ОБИТАЮЩИХ В ЗОНАХ С РАЗЛИЧНЫМ УРОВНЕМ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПОЧВ, МЕТОДОМ ДНК-КОМЕТ

А.Э. СИМОНЯН¹, А.Л. ГЕВОРКЯН¹, С.Г. МИНАСЯН³,
А.А. САРГСЯН¹, М.С. АРАКЕЛЯН²

¹Ереванский государственный университет, кафедра генетики и цитологии,
²кафедра зоологии, ³Институт химической физики НАН РА
genetanatgc@yahoo.com

Уровень повреждений ДНК в эритроцитах скальных ящериц *Darevskia raddei* из заповедника Шикаох и Каджарана (Республика Армения) и Зуара (Нагорно-Карабахская Республика) оценивали методом ДНК-комет. Самки ящериц оказались более чувствительны к загрязнителям среды, чем самцы. Показана достоверная положительная корреляция между уровнем повреждений ДНК у самок и содержанием Cu, Mo, Pb, Cd, V и As в почве.

Метод ДНК-комет – скальные ящерицы- генотоксичность почвы

ԴՆԹ-ի վնասվածքների մակարդակը գնահատվել է Շիկահողի արգելոցում, Քաջարանում (Հայաստանի Հանրապետություն) և Զուարում (Լեռնային Ղարաբաղի Հանրապետություն) բնակվող *Darevskia raddei* ժայռային մողեսների էրիթրոցիտներում՝ ԴՆԹ-կոմետ մեթոդով: Ցույց է տրվել, որ էգ մողեսները ավելի զգայուն են շրջակա միջավայրի աղտոտիչների նկատմամբ, քան արուները: Հավաստի դրական կորելյացիա է հայտնաբերվել էգ մողեսների ԴՆԹ-ի վնասվածքների և հողում Cu, Mo, Pb, Cd, V ու As պարունակության միջև:

ԴՆԹ-կոմետ մեթոդ – ժայռային մողեսներ – հողի գենատոքսիկություն

The levels of DNA damage in erythrocytes of rock lizards *Darevskia raddei* from reserve Shikahogh and Kajaran (Republic of Armenia) and Zuar (Nagorno-Karabakh Republic), were assessed using the comet assay. Female lizards were more sensitive to environmental pollutants than males. Significant positive correlation was found between DNA damage in female lizards and content of Cu, Mo, Pb, Cd, V and As in soil.

Comet assay-rock lizards-soil genotoxicity

Загрязнение почв является одним из основных путей попадания в окружающую среду различных загрязнителей. Одним из основных методов оценки генетических эффектов в экотоксикологических исследованиях является метод ДНК-комет, который позволяет оценивать повреждения и репарацию ДНК. Для оценки влияния генотоксических загрязнителей почвы в качестве биоиндикаторов применяют растения, грызунов и дождевых червей [1]. Важной задачей экогенотоксикологии является адаптация метода ДНК-комет к различным диким видам, распространенным на загрязненных территориях и проявляющих достаточно высо-

кую чувствительность к мутагенам. В частности, чувствительными биоиндикаторами загрязнения среды являются пресмыкающиеся, однако в настоящее время их применение в экогенотоксикологии ограничено [2]. Ящерицы чувствительны к загрязнению среды, в частности, тяжелыми металлами [3]. Показана эффективность генетического мониторинга у ящериц с применением метода ДНК-комет [4].

В Армении распространены скальные ящерицы *Darevskia raddei*, возможность использования которых в качестве биоиндикаторов загрязнения почв изучена в представленной работе. С этой целью были проанализированы уровни повреждений ДНК у ящериц *D. raddei*, обитающих в Шикаохе, Каджаране и Зуаре методом ДНК-комет.

Материал и методика. Повреждения ДНК оценивали в эритроцитах самок и самцов скальных ящериц *D. raddei* из заповедника Шикаох (9 самок и 6 самцов) и Каджарана, (6 самок и 5 самцов) Армении и Зуара, (10 самок и 7 самцов) Нагорный Карабах. Заповедник Шикаох был выбран в качестве контрольного сайта. Почва в Каджаране загрязнена выбросами медно-молибденового комбината. Почва Зуара обогащена рядом соединений в связи с высоким уровнем сейсмической активности в этом районе.

Образцы крови брались из хвостовой вены от каждой ящерицы. Гепаринизированная кровь разбавлялась PBS (phosphate-buffered saline) в соотношении 1:80. Для оценки повреждений ДНК применяли щелочную версию метода комет [5]. На предметные стекла, покрытые слоем 1%-ного раствора агарозы, капали смесь 10 мкл крови с 90 мкл легкоплавкой агарозы (LMA). Препараты помещали в лизирующий раствор (2.5 M NaCl, 100 mM ЭДТА, 10 mM Трис, pH 10.0 с Тритоном X-100) на 24 ч при 4°C. По окончании лизиса препараты погружали в щелочной буфер (300 mM NaOH и 1 mM ЭДТА) на 20 мин для раскручивания цепей ДНК. Электрофорез проводили 15 мин (26 В и 300 мА). Препараты промывали нейтрализационным буфером (0.4 мкг/мл Трис, pH 7.5) и окрашивали бромистым этидием (4 мкг/мл). Оценку процента ДНК в хвосте кометы и момент хвоста кометы проводили с применением программы Comet Assay VI. Статистическую обработку данных проводили с применением Multiple range test и корреляционного анализа Пирсона по статистической программе Statgraphics Centurion 16.2.

Результаты и обсуждение. Анализ повреждений ДНК у скальных ящериц *D. raddei* с применением мультифакториального анализа (MANOVA) показал, что в загрязненном Каджаране процент ДНК в хвосте кометы у самок (21.22 ± 2.18) достоверно выше, чем у самцов (15.85 ± 1.98 , $p < 0.001$). В Шикаохе процент ДНК в хвосте кометы у самок (14.60 ± 1.68) и самцов (16.22 ± 1.66) достоверно не различается. Также не обнаружены различия между процент ДНК в хвосте кометы у самок (7.61 ± 0.72) и самцов (6.68 ± 0.61) из относительно экологически чистой территории Зуара. Принимая во внимание различия в чувствительности к загрязнителям среды между полами у ящериц из загрязненной зоны, сравнение повреждений ДНК в изученных сайтах было проведено только на самках (табл. 1).

Таблица 1. Повреждения ДНК у самок скальных ящериц *D. raddei*, обитающих в заповеднике Шикаох, Каджаране и Зуаре

Среда обитания	Количество ящериц	% ДНК в хвосте кометы	Момент хвоста
Шикаох	6	14.60 ± 1.68^b	2.66 ± 0.27
Каджаран	5	$21.22 \pm 2.18^{a,b}$	$4.68 \pm 0.63^{a,b}$
Зуар	7	7.61 ± 0.72	1.12 ± 0.09

a- достоверная разница по сравнению с контрольным сайтом (Шикаох), $p < 0.01$

b- достоверная разница по сравнению с Зуаром, $p < 0.01$

У ящериц Каджарана обнаружено достоверное повышение процента ДНК в хвосте кометы и момента хвоста как по сравнению с контрольным сайтом (Шикаох), так и с Зуаром. Также показано, что уровень повреждений ДНК по параметру процента ДНК в хвосте кометы у ящериц Шикаоха выше, чем у ящериц Зуара. Таким образом, по показателям повреждений ДНК у ящериц *D. raddei* территория Каджарана является наиболее загрязненной генотоксикантами. Несмотря на сейсмоактивность, уровень генотоксической загрязненности в Зуаре ниже, чем в Шикаохе.

Связь между повреждениями ДНК у ящериц *D. raddei* и загрязнением почв Co, Cr, Cu, Zn, Mo, Ag, Pb, Cd, P, V и As проанализирована с применением корреляционного анализа. Обнаружена достоверная положительная корреляция между процентом ДНК в хвосте кометы и моментом хвоста и содержанием Cu, Mo, Pb, Cd, V и As (табл. 2).

Таблица 2. Коэффициент корреляции Пирсона между повреждениями ДНК (%ДНК в хвосте кометы) у ящериц *D. raddei* и уровнем загрязнителей в почве, а также содержание в почве исследованных элементов, мг/кг

Загрязнители в почве	Содержание в почве загрязнителей, мг/кг			Коэффициент корреляции Пирсона
	Шикаох	Каджаран	Зуар	
Cu	0.02	0.54	0.04	0.64*
Mo	0.0006	0.05	0.0006	0.65*
Pb	0.008	0.02	0.01	0.58*
Cd	0.00017	0.0002	0.00018	0.50*
V	0.09	0.29	0.06	0.69*
As	0.006	0.03	0.007	0.64*

* – достоверная положительная корреляция, $p < 0.05$

Полученные результаты свидетельствуют о том, что анализ повреждений ДНК методом ДНК-комет у скальных ящериц *D. raddei* является чувствительным индикатором генотоксичности почвы и может успешно применяться для оценки загрязнения окружающей среды.

ЛИТЕРАТУРА

1. de Lapuente J., Lourenço J., Mendo S.A., Borràs M., Martins M.G., Costa P.M., Pacheco M. The Comet Assay and its applications in the field of ecotoxicology: a mature tool that continues to expand its perspectives. *Front Genet*, 4, 6, 180, 2015.
2. Hopkins, W.A. Reptile toxicology: challenges and opportunities on the last frontier in vertebrate ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19, 2391-2393, 2000.
3. Oyekunle J.A. O., Adekunle A.S., Ogunfowokan A.O., Akanni M.S., Coker O.S. Agama lizard: A potential biomarker of environmental heavy metal pollution assessment. *African Journal of Environmental Science and Technology*, 12, 6, 458-463, 2012.
4. Schaumburg L.G., Poletta G.L., Siroski P.A., Mudry M.D. Baseline values of Micro-nuclei and Comet Assay in the lizard *Tupinambis merianae* (Teiidae, Squamata) *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 84, 99-103, 2012.
5. Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.C., Sasaki Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*, 35, 206-221, 2000.

Поступила 25.08.2015



Biolog. Journal of Armenia, 4 (67), 2015

ADSORPTION OF CATIONIC PORPHYRINS BY NANOPARTICLES OF ZEOLITE AND SILVER

A.G. GYULKHANDANYAN

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

The complexation of cationic porphyrins and metalloporphyrins with nanoparticles of zeolite and nanoparticles of anisotropic silver in aqueous solutions is investigated. Study of porphyrins desorption showed that under the influence of monovalent and divalent salts (NaCl and CaCl_2) a complete desorption of porphyrins and metalloporphyrins from silver nanoparticles occurs, whereas from zeolite nanoparticles desorption does not occur.

Cationic porphyrins – zeolite nanoparticles – silver nanoparticles

Ուսումնասիրվել է կատիոնային պորֆիրինների և մետաղապորֆիրինների կոմպլեքսացումը ցելիտի և անիզոտրոպ արծաթե նանոմասնիկների հետ ջրային լուծույթներում: Պորֆիրինների դեսորբցիայի հետազոտությունները ցույց տվեցին, որ միավալենտ և երկվալենտ աղերի (NaCl և CaCl_2) ազդեցության տակ արծաթե նանոմասնիկներից տեղի է ունենում պորֆիրինների և մետաղապորֆիրինների ամբողջական դեսորբցիա, մինչդեռ ցելիտի նանոմասնիկներից դեսորբցիա տեղի չի ունենում:

Կատիոնային պորֆիրիններ – ցելիտի նանոմասնիկներ – արծաթե նանոմասնիկներ

Исследовано комплексообразование катионных порфиринов и металлопорфиринов с наночастицами цеолита и анизотропного серебра в водных растворах. Изучение десорбции порфиринов показало, что при действии одновалентных и двухвалентных солей (NaCl и CaCl_2) происходит полная десорбция порфиринов и металлопорфиринов с наночастиц серебра, тогда как с наночастиц цеолита десорбции не происходит.

Катионные порфирины – наночастицы цеолита – наночастицы серебра

The search for new methods for photodynamic therapy of cancer (PDT) and the fight against antibiotic-resistant microorganisms is one of actual problems of modern medicine. In both directions, photosensitizers (PS) have been used with high efficiency. In PDT [1] and for photodynamic inactivation of microorganisms (PDI) [2] PS are a widely used as preparations, which selectively accumulates in tumor cells and microorganisms and exposed to light causes irreversible destruction of tumors and bacteria [2].

Currently in Armenia more than 100 new cationic porphyrins and metalloporphyrins are being synthesized [3] (fig. 1) and *in vitro* in the laboratory their high effectiveness against different cancer cell lines, and against different microorganisms were shown [4, 5].

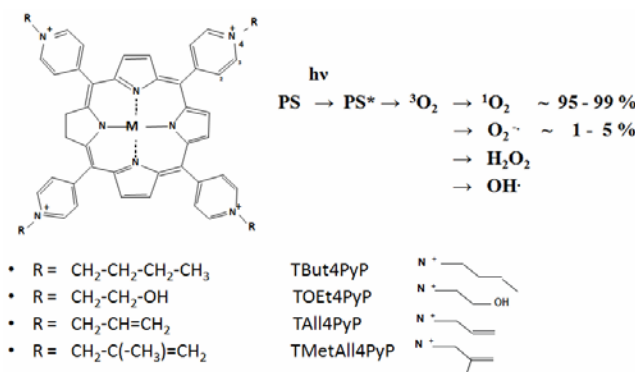


Fig. 1. Cationic porphyrins and metalloporphyrins and the formation of toxic reactive oxygen species. M – the central metal atom in the metalloporphyrins, R – peripheral functional groups.

One of the promising approaches enhance the effectiveness of PDT of tumors and PDI of microorganisms is the use of nanocontainers from nanoparticles of precious metals (gold and silver) [6]. Selection another inorganic nanoplatform of zeolite nanoparticles was due to their special properties. They occupy a special place among other nanoparticles due to the unique sorption capacity and high biological activity.

To enhance the effectiveness and targeted delivery of photosensitizers for PDT of tumors and PDI of microorganisms we used zeolites and anisotropic nanoparticles of silver. For this purpose we studied the adsorption of different cationic porphyrins and metalloporphyrins via zeolite nanoparticles and nanoparticles of anisotropic silver as well as desorption of porphyrins from formed nanocomposites was investigated.

Materials and methods. Study of processes sorption and quantitative description of the binding of porphyrin molecules with the nanoparticles of zeolite and silver 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. Anisotropic silver nanoparticles were purchased from "Biovar" Co. Ltd., Yerevan, Armenia.

Zeolite nanoparticles. Nanoparticles of natural zeolite mineral - clinoptilolite of nanometric sizes were obtained by mechanical crushing and subsequent sedimentation in aqueous solution [7]. The size of nanoparticles by laser analyzer type IG-1000 (Shimadzu, Japan), range 0.5 – 200 nm, or electron microscopy was monitored.

Results and Discussion. To study the binding of zeolite of and silver nanoparticles to porphyrins were selected 5 types of cationic porphyrins so that they differed by hydrophobicity (various peripheral groups), by the presence of a hydroxyl group (for studying the possible hydrogen bonding to the surface of the zeolite), by the presence of central metal atom (metal-free and with Zn), by different positions of the side functional group (3rd or 4th position in the pyridyl ring): TOEt4PyP; TBut3PyP; Zn-TOEt4PyP; Zn-TBut3PyP; Zn-TBut4PyP. To achieve the maximum gain of PDT of tumors, as well as PDI of microorganisms under photodynamic action is necessary desorption of porphyrins with nanoparticles.

Since binding of porphyrins as a ligand to nanoparticles in the initial phase of interactions is determined by Brownian motion of porphyrins, from the thermodynamic considerations to be expected that the interaction of porphyrins with nanoparticles can be temperature dependent. Comparison of two temperature modes (18⁰C and 37⁰C) of the binding the metalloporphyrin Zn-TOEt4PyP, Zn-TBut3PyP and others porphyrins with zeolite nanoparticles by absorption and fluorescence spectroscopy methods showed an

apparent temperature dependence of such a process. Study of the action of monovalent and divalent salts (NaCl and CaCl_2) has shown that desorption of porphyrins and metalloporphyrins from formed zeolite nanocomposites does not occur.

Among the many types of nanoparticles-nanocontainers used to enhance the efficiency and for targeted delivery of photosensitizers, anisotropic silver nanoparticles occupy a special place due to a number of rare valuable qualities. We have studied the interaction of silver nanoparticles with the above mentioned cationic porphyrins and Zn-metalloporphyrins and had shown that the formation of nanocomposites is mainly occurs due to the electrostatic interaction between the positively charged groups of porphyrins with the surface of nanoparticles of the anisotropic silver (the binding more than 70%). By absorption and fluorescence spectroscopy is shown that under the action of monovalent and divalent salts (NaCl and CaCl_2) comes a complete desorption of porphyrins and metalloporphyrins from silver nanoparticles. Thus, due to this as nanocontainers of photosensitizers anisotropic silver nanoparticles can be much more effective than the zeolite nanoparticles.

Acknowledgements. The study was sponsored by the State Committee for Science of the Ministry of Education and Science of Armenia in the framework of a research project number 13PE-055. Author also expresses gratitude to docent R.K. Ghazaryan for the kindly providing porphyrins for use in the work.

REFERENCES

1. Castano A.P., Mroz P. and Hamblin M.R. Photodynamic therapy and anti-tumor immunity. *Nature Reviews Cancer*, 6, 535-545, 2006.
2. Hamblin M.R., O'Donnell D.A., Mufthy N., Rajagopalan K., Michaud N., Sherwood M.E., Hasan T. Polycationic photosensitizer conjugates: effects of chain length and Gram classification on the photodynamic inactivation of bacteria. *J. Antimicrob. Chemotherapy*, 49, 941-951, 2002.
3. Tovmasyan A.G., Ghazaryan R.K., Sahakyan L., Gasparyan G., Babayan N. and 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, 71-72, 2007.
4. Tovmasyan A., Babayan N., Sahakyan L., Shahkhatuni A., Gasparyan G., Aroutiounian R. and Ghazaryan R. Synthesis and *in vitro* anticancer activity of water-soluble cationic pyridylporphyrins and their metallocomplexes. *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 12, 1100-1110, 2008.
5. Gyulkhandanyan G.V., Paronyan M.H., Hovsepyan A.S., Ghazaryan R.K., Tovmasyan A.G., Gyulkhandanyan Aram G., Gyulkhandanyan Anna G. and Amelyan G.V. Photodynamic inactivation of Gram (-) and Gram (+) microorganisms by cationic porphyrins and metalloporphyrins. *Proc. SPIE*, 7380, 73803I-1 - 73803I-7, 2009.
6. Khlebtsov B.N., Tuchina E.S., Khanadeev V.A., Panfilova E.V., Petrov P.O., Tuchin V.V., and Khlebtsov N.G. Enhanced photoinactivation of *Staphylococcus aureus* with nanocomposites containing plasmonic particles and hematoporphyrin. *J. Biophotonics*, 6, 4, 338-351, 2013.
7. 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 24.06.2015



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 4(67), 2015

ԼՈՒԻԿԻ ՑԵՑԻ ՁԵՎԱԲԱՆԱԿԱՆ ԵՎ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ ԱՐԱՐԱՏՅԱՆ ՀԱՐԹԱՎԱՅՐԻ ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ

Հ.Լ.ԹԵՐԼԵՄԵՅՅԱՆ, Լ.Խ.ՍԱՐԳՍՅԱՆ

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

Ուսումնասիրվել է լուիկի հարավամերիկյան ցեցի (*Tuta absoluta* Meyr.) ձևաբանական և կենսաբանական առանձնահատկությունները Արարատյան հարթավայրի պայմաններում: Բացահայտվել է, որ տարվա եղանակային պայմաններից կախված վնասատուի սաղմնային զարգացումը տևում է 5-7, հետսաղմնային՝ 12-14, հարսնյակին՝ 8-11 օր: Ֆիտոֆագի մեկ սերնդի զարգացումը տևում է 25-32 օր: Բաց գրունտի պայմաններում վնասատուն վեգետացիայի ընթացքում զարգանում է 5-6 սերնդով:

Լուիկի հարավամերիկյան ցեց – ձևաբանություն – կենսաբանական առանձնահատկություններ

Изучены морфологические и биологические особенности южноамериканской томатной моли (*Tuta absoluta* Meyr.) в Араратской долине. Выявлено, что в зависимости от погодных условий года эмбриональное развитие вредителя длится 5-7, пост-эмбриональное – 12-14 сут. Куколка вредителя развивается 8-11 сут. Развитие одного поколения фитофага длится от 25 до 32 сут. В условиях открытого грунта вредитель развивается в 5-6 поколениях.

Южноамериканская томатная моль – морфология – биологические особенности

The morphological and biological characteristics of the South American tomato moth (*Tuta absoluta* Meyr.) is studied in the Ararat valley. It is revealed that depending on the weather conditions the pest develops in embryonal stage within 5-7, in larval stage – 12-14, in pupae stage – 8-11 days. The development of one generation of the phytofae lasts 25-32 days. Under the open ground vegetation the pest develops within 5-6 generation.

South American tomato moth – morphology – biological characteristics

Լուիկը Հայաստանի Հանրապետությունում մշակվող ամենատարածված և արժեքավոր բանջարանոցային մշակաբույսերից է, որին վերջին տարիներին մեծ վնաս է հասցնում լուիկի հարավամերիկյան ցեցը (*Tuta absoluta* Meyr.): Վերջինս այստեղ առաջին անգամ հայտնաբերվել է 2012 թ.: Այն արձանագրված է բազմաթիվ երկրներում և համարվում է լուիկի ամենավտանգավոր ֆիտոֆագերից մեկը [2, 4, 5, 6]:

Այս վնասատուի հասցրած վնասը և ընդգրկման արեալը տարեց տարի ավելանում է, ուստի ցեցի դեմ արդյունավետ պայքարելու համար անհրաժեշտ է ուսումնասիրել այդ վնասատուի զարգացման ձևաբանական և կենսաբանական առանձնահատկությունները:

Նյութ և մեթոդ: Հետազոտությունները կատարվել են 2014-2015 թթ.-ին լաբորատոր և դաշտային պայմաններում:

Հետազոտության նյութ են հանդիսացել լուիկի հարավամերիկյան ցեցի (*T. absoluta*) ձվերը, թրթուրները, հարսնյակները և հասուն առանձնյակները:

Վնասատուի սերունդների քանակը բացահայտվել է Արարատի մարզի Գոռավան գյուղի ֆերմերային տնտեսության լուրջ տնկարկներում տեղադրված կապրոնե մեկուսիչներում, ինչպես նաև ֆերմոնային թակարդներում, իսկ կենսակերպի որոշ առանձնահատկությունները (առանձին փուլերի զարգացման ընթացքը, պտղաբերությունը)՝ Սննդամթերքի անվտանգության ոլորտի ռիսկերի գնահատման և վերլուծության գիտական կենտրոնի միջատաբանական լաբորատորիայում: Այդ նպատակով վնասատուի համապատասխան փուլերը տեղադրվել են լուրջ տերևների վրա և մեկուսացվել կապրոնե մեկուսիչներում: Հասունը կերակրվել է 5 %-անոց շաքար-բաքրի օշարակով: Ֆիտոֆագի ձվերը տեղադրվել են Պետրիի թասերի մեջ և ամենօրյա դիտարկումներով կատարվել են հաշվառումներ: Ձվից դուրս եկած թրթուրները առանձնացվել են 10-ական հատ, դարձյալ տեղադրվել Պետրիի թասերի մեջ և դիտարկվել դրանց զարգացման ընթացքը: Փորձերն կատարվել են 10-ական կրկնողությամբ:

Լուրջի հարավամերիկյան ցեղի (ձու, թրթուր, հարսնյակ, հասուն) ձևաբանական և գծային չափումները կատարվել են BM-100FL մակնիշի մանրադիտակով [3]:

Արդյունքներ և քննարկում: Վնասատուի ձևաբանական և կենսաբանական առանձնահատկությունները:

Ցեղի թիթեռը մոխրագույն է, փոքր չափերի՝ 5-6 մմ: Անշարժ վիճակում թևերը ծավալած են մեջքի վրա: Էգերը թևերի բացվածքով 10-12 մմ են, արուները՝ 2,0-2,5 մմ-ով պակաս: Թևերը բաց մոխրագույն են, կենտրոնական մասում՝ դեղնավուն բծով, ընդլայնական ջղի վրա առկա են մի շարք մուգ սև կետիկներ: Առջևի թևերի ծոփերը բաց մոխրագույն են՝ ներսի կողմից ավելի մուգ փառով: Երկրորդ գույգ թևերն ունեն դեղնավուն մազմուկներով ծածկված ծոփեր: Վերջինս թևիկից երկար է: Ներքևի մասը միատարր մոխրագույն է: Արուների առջևի թևերի վրա մեջտեղի ծալքի երկայնքով կա սև երկայնակի շերտագիծ: Փորիկը վերնամասում դեղնամոխրագույն է, իսկ ստորին հատվածում՝ մոխրագույն-սպիտակ: Վնասատուի բեղիկները սև են՝ բաց մոխրագույն բծերով: Գլուխը մոխրագույն է, որը մզանում է պարանոցի ուղղությամբ: Արուներն ունեն մի փոքր ավելի մուգ գունավորում:

Ձուն ունի էլիպսա-գլանաձև տեսք, 0,3-0,4 մմ երկարություն և 0,2-0,25 մմ լայնություն, բաց դարչնա-դեղնավունից մուգ դեղնավուն երանգի: Ձվերը ծածկված են արտազատուկով, իսկ թաղանթն ունի որոշակի անհարթություն: Ձուն սաղմի զարգացմանը զուգընթաց մզանում է:

Մշակաբույսերին վնասում է ֆիտոֆագի թրթուրը: Նոր դուրս եկած թրթուրներն անգույն են, բաց կանաչավունից դեղնավարդագույն երանգի: Թրթուրը զարգացման ընթացքում գունափոխվում է դեղնականաչավունի: Մեջքի մասում հաճախ նկատվում է վառ վարդագույն երանգ, սովորաբար հետքերի նման արտահայտված կամ լայնակի գոլերով:

Հասուն թրթուրը գլանաձև է, ունի լավ արտահայտված գլուխ, 3 գույգ կրծքային և 5 գույգ որովայնային ոտքեր մոտ 9 մմ երկարություն:

Հարսնյակը կոնաձև է՝ մոխրա-կանաչավուն երանգի, ունի 5-6 մմ երկարություն և 1,2-1,6 մմ լայնություն: Զարգացման վերջում այն ամբողջությամբ դառնում է շագանակագույն:

Ֆիտոֆագի պտղաբերությունն Արարատյան հարթավայրի պայմաններում կազմում է 180-220 ձու, որոնք դրվում են մեկական կամ փոքրիկ խմբերով: Ըստ գրական տվյալների լուրջի ցեղը կարող է դնել 250-300 ձու [2]:

Վնասատուի սաղմնային զարգացումը եղանակային պայմաններից կախված տևում է 5-7, հետսաղմնային զարգացումը՝ 12-14, հարսնյակինը՝ 8-11 օր:

Ձվից նոր դուրս եկած թրթուրները սկզբում բաց կանաչավուն են, սև գլխով, որոնք հետագայում աստիճանաբար մզանում են, դառնում դեղնակարմրավուն:

Թրթուրները մինչև հարսնյակավորվելն անցնում են զարգացման 4 հասակ: Հարսնյակային փուլն ընթանում է հողում, տերևի վրա կամ ծաղկակոկոններում և տևում է 9-11 օր:

Արարատյան հարթավայրում ֆիտոֆագի մեկ սերնդի զարգացումը տևում է 25-32 օր:

Վեգետացիայի ընթացքում բաց գրունտի պայմաններում վնասատուն զարգանում է 5-6 սերնդով:

Հարսնյակից դուրս եկած թիթեռները չեն սնվում և կարող են ապրել ավելի քան 10 օր: Ցերեկային ժամին դրանք թաքնվում են տեր բույսի վրա և հիմնականում նստում են տերևների ստորին մակերեսին, ակտիվանում են մայրամուտից հետո և լուսաբացին: Զուգավորումը սովորաբար կատարվում է հասուն առանձնյակների ի հայտ գալու առաջին օրվա ընթացքում, որպես կանոն լուսաբացին:

Էզը ձվերի մեծ մասը դնում է զուգավորումից հետո առաջին երեք օրվա ընթացքում:

Ձվից դուրս եկած թրթուրները սնվելով, անկանոն ականներ են բացում տերևի մակերեսին:

Ավելի մեծ հասակի թրթուրները կարող են ներթափանցել տերևակոթի մեջ, այդ դեպքում տերևն ամբողջությամբ չորանում է: Կանաչ կամ հասուն պտուղներով սնվելիս դրանք կորցնում են ապրանքային տեսքը:

Եթե թրթուրը սնվում է ցողունի (ավելի հաճախ ընձյուղի) մեջ, վնասվածքից բարձր բույսը չորանում է:

Թրթուրներով վնասվածության բնորոշ արտաքին նշանը վնասված բույսի կամ պտղի մակերեսին արտաթորանքի կուտակումն է, որը պատված է ոստայնով:



Նկ.1. Լուիկի ցեցի (*Tuta absoluta*) զարգացման տարբեր փուլերը

1– հասուն, 2– ձու, 3– թրթուր, 4– հարսնյակ

Լուիկի ցեցի հասուն թրթուրը, հարսնյակը կամ թիթեռը ձմեռում են հողի մակերեսային շերտում, ինչպես նաև բուսական մնացորդների տակ:

Արարատյան հարթավայրի պայմաններում, ինչպես ցույց տվեցին մեր հետազոտությունները, Լուիկի ցեցի մեկ սերնդի զարգացումը տևում է 25-32 օր:

Վեգետացիայի ընթացքում բաց գրունտի պայմաններում վնասատուն զարգանում է 5-6 սերնդով:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. *Ахатов А.К., Ганнибал Ф.Б., Мешков Ю.И.* Болезни и вредители овощных культур и картофеля, М., 210-211, 2013.
2. *Клечковский Ю.Э., Черней Л.Б., Вовкодуб О.Н.* Томатная моль – новая угроза сельскому хозяйству. Защита и карантин растений, 4, 36-39, 2014.
3. Практикум по микробиологии, М., МГУ, с.126-130, 1976.
4. *Равашдех Шариф Халид Абдул-Азиз, Заец В.Г.* Томатная минирующая моль – опасный карантинный вредитель томата. Защита и карантин растений, 12, 35-36, 2011.
5. *Синев А.К., Ижевский С.С., Ахатов С.Ю.* Томатная минирующая моль выявлена уже в России //Защита и карантин растений, 3, с. 40-44, 2011.
6. *Urbaneja A., Vercher R., Navarro V., Garcia Mari F., Porcuna J.L.* La polilla del tomate, *Tuta absoluta*. Phytoma Espana, 194 p. 16-23, 2007.

Ստացվել է 16.09.2015