



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

2016

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.Հ. 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, Ժ.Ի. Հակոբյան, Վ.Պ. Հակոբյան,
Ս.Հ. Մովսիսյան, Կ.Ս. Պոգոսյան, Գ.Հ. Փանոսյան, Լ.Լ. Օսիպյան

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Յ.Ս. Գևորգյան (*главный редактор*), Ռ.Մ. Արությունյան (*заместитель главного редактора*), Ա.Հ. Եսայան (*ответственный секретарь*), Գ. Գ. Գևորգյան, Ա.Ա. Թրչունյան, Ա.Ր. Մանվելյան, Ս.Մ. Մայրապետյան, Զ.Ա. Վարդանյան

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Ю.Т. Алексанян, Э.Г., Африкян, 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-editor* R.M. Aroutiunian,
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, Zh.I. Hakobyan, V.P. Hakobyan,
S.H. Movsesyan, K.S. Poghosyan, G.H. Panosyan, L.L. Osipyan

•Փորձարարական և տեսական հոդվածներ•

Հովհաննիսյան Ա.Ա. Հայերը Հարավարևմտյան Ասիայի գենետիկական բարտեզի վրա ըստ լայնագենոմային աուտոսոմային տվյալների.....	6
Մարգարյան Ա.Վ. Ուղեղիկի կեղևի և միջակա ցանցաձև գոյացության փոխգործոլությունը.....	10
Հարությունյան Մ.Ժ., Շահինյան Լ.Վ., Խաչատրյան Տ.Լ., Նանագյուլյան Ս.Գ. Խաղողի վազի օիդիում և միլդյու սնկային հիվանդություններով վարակման աստիճանի կախվածությունը պարարտացումից.....	14
Խաչատրյան Գ.Է., Սիմոնյան Ն.Վ., Մկրտչյան Ն.Ի., Առաքելյան Վ.Բ., Թաթևկյան Ս.Շ., Ցականով Վ.Մ., Անտոնյան Պ.Մ., Զարամյան Ս.Կ., Հարությունյան Վ.Վ. Տիեզերական կենսաբանության որոշ խնդիրների մոդելավորումը Երկրի պայմաններում.....	21
Դյուկովա Կ.Գ., Իզմաիլյան Մ.Ս., Մանուկյան Լ.Ս., Ղուկիյան Վ.Տ. Գետնախնձորից (<i>Helianthus tuberosus</i>) ինուլինազի անջատումը, մաքրումը և բնութագրումը.....	30
Կոծիկյան Ա.Ռ. Խոզերի աֆրիկյան ժանտախտի վիրուսի (ԽԱԺՎ) ֆիլոգենետիկական հիմնված որոշ սպիտակուցների համեմատական վերլուծության և բայեսյան արտածման վրա.....	38
Թովուկյան Վ.Օ., Խաչատրյան Տ.Ս. N-տեղակաված- α , β -դեհիդրոամինաթթուների խոլինի եթերների դերը ցածր տրիդոպիկոնինի սինդրոմի բարելավման գործընթացում ողնուղեղի կիսահատման պայմաններում.....	49
Սապոնջյան Ե.Յ. X-թրոմոսոմով պայմանավորված մկանային դիստրոֆիայով (<i>mdx</i>) մկան կմախքային դիստրոֆիկ մկաններում անընդհատ կրկնվող դեգեներատիվ և ռեգեներատիվ ցիկլերը հանգեցնում են համատարած կենտրոնական կորիզով մանրաթելերի առկայությանը.....	56
Մանուկյան Կ.Գ., Ստեփանյան Յ.Ա., Լևոնյան Կ.Լ., Ղազարյան Տ.Ի., Կիրակոսյան Լ.Գ. Առնետի տարբեր օրգանների բջիջների միտոքոնդրիումներից անջատած պրոտեոլիպիդների սպիտակուցային և լիպիդային բաղադրիչների առանձնահատկությունները.....	61
Պիպոյան Ս.Խ., Առաքելյան Ա.Ս., Գալստյան Լ.Գ., Գաբայան Ի.Ս. Դեբեդ գետի ավազանի փոքր հիդրոէլեկտրակայանների ձկնուղիները և դրանց նշանակությունը ձկնաշխարհի պահպանության համար.....	69
Մնացականյան Ն.Ս., Թռչունյան Ա.Յ. Ծակոտկեն հանքային տուֆից եվ արծաթի նանոմասնիկներից բաղկացած նանոկոմպոզիտ գտիչի ախտահանող հատկությունները և նրա կիրառումը մեծ ծավալով ջրերի զտման համար.....	75
Շատրյան Մ.Ս. Ամմոռուկ դաշտայինի (<i>Myosotis arvensis</i> (L.) HILL բնութագիրը, տարածվածությունը, ագրոտեխնիկան և արտադրությունում ներդրելու հնարավորություններ.....	82
Հարությունյան Ա.Ա., Ավակիմյան Զ.Ա., Ստեփանյան Յ.Մ. Պիրիմիդինի և բենզիմիդազոլի մի բանի պոլիցիկլիկ հետերոցիկլերի հակամանրեային հատկությունները.....	88
Ավթանդիյան Ն.Վ., Կարապետյան Ս.Ա., Ալեքսանյան Զ.Ա. Արյան շիճուկի արգինազի ակտիվության և պոլիամինների քանակական փոփոխության փոխկապակցվածությունը կրծքագեղձի քաղցկեղի ժամանակ.....	92
Աղամյան Ն.Յու. Որոշ ֆունկցիոնալ խանգարումների շտկումը ոչ դեղորայքային բուժման մեթոդով.....	100
Վարդանյան Ն.Ս., Սևոյան Գ.Գ., Նավասարդյան Ս.Վ., Վարդանյան Ա.Կ., Նավասարդյան Տ.Ս. Շահումյանի բազմամետաղային հանքաքարի հարստացման պղնձների կենսա-հիդրոմետալուրգիական մշակումը արժեքավոր մետաղների կորզման նպատակով.....	104

СОДЕРЖАНИЕ

•Экспериментальные и теоретические статьи•

<i>Оганесян А.А.</i> Локализация армян на генетической карте Юго-Западной Азии по данным широкогеномного аутосомального анализа	6
<i>Маргарян А.В.</i> О взаимодействии коры мозжечка и медиальной ретикулярной формации.....	10
<i>Арутюнян М.Ж., Шагинян Л.В., Хачатрян Т.Л., Нанагюлян С.Г.</i> Степень пораженности виноградной лозы грибами оидиумом и милдью в зависимости от удобрений	14
<i>Хачатрян Г.Э., Симонян Н.В., Мкртчян Н.И., Аракелян В.Б., Татикян С.Ш., Цаканов В.М., Антонян П.М., Карамян С.К., Арутюнян В.В.</i> Моделирование некоторых задач космической биологии в земных условиях.....	21
<i>Дюкова К.Г., Измаилян М.С., Манукян Л.С., Кочикян В.Т.</i> Выделение, очистка, характеристика инулиназы из клубней топинамбура (<i>Helianthus tuberosus</i>)	30
<i>Коцинян А.Р.</i> Филогения вируса Африканской чумы свиней, основанная на сравнительном анализе и байесовском выводе для ряда протеинов	38
<i>Топузян В.О., Хачатрян Т.С.</i> Роль холиновых эфиров N-замещённых- α , β -дегидроаминокислот в коррекции синдрома низкого триптофанина при гемисекции спинного мозга у крыс... ..	49
<i>Сапонджян Е.Г.</i> Непрерывно повторяющиеся циклы дегенерации и регенерации дистрофических волокон в скелетных мышцах мыши с мышечной дистрофией, сцепленной с X-хромосомой (mdx), приводит к повсеместному присутствию центральоядерных мышечных волокон.....	56
<i>Манукян К.Г., Степанян А.А., Левонян К.Л., Казарян Т.И., Киракосян Л.Г.</i> К характеристике белковых и липидных компонентов протеолипидов из митохондрий клеток разных органов крысы.....	61
<i>Пипоян С.Х., Аракелян А.С., Галстян Л.Г., Габаян И.С.</i> Рыбопропускные сооружения малых гидро-электростанций на реках бассейна реки Дебед и их значение для охраны ихтиофауны.....	69
<i>Мнацаканян Н.С., Трчунян А.А.</i> Обеззараживающие свойства нанокompозитного фильтра на основе пористого минерала туфа и наночастиц серебра и его применение для фильтрации больших объемов воды.....	75
<i>Цатрян М.С.</i> Характеристика, распространенность, сельскохозяйственная техника незабудки полевой (<i>Myosotis arvensis</i> (L.) и возможности его введения в производство.....	82
<i>Арутюнян А.А., Авакисян Дж.А., Степанян Г.М.</i> Антибактериальные свойства некоторых полициклических гетероциклов на основе пиримидина и бензимидазола.....	88
<i>Автандилян Н.В., Карапетян С.А., Алексанян К.А.</i> Взаимосвязь между аргиназой активностью и изменением количества полиаминов в сыворотке крови человека при раке молочной железы	92
<i>Адамян Н.Ю.</i> Коррекция некоторых функциональных нарушений нефармакологическим методом лечения.....	100
<i>Варданян Н.С., Севоян Г.Г., Навасардян С.В., Варданян А.К., Навасардян Т.С.</i> Биогидрометаллургическая переработка хвостов обогащения полиметаллической руды Шаумяна с целью извлечения ценных металлов.....	104

CONTENTS

•Experimental and theoretical articles•

<i>Hovhannisyan A.A.</i> Armenians on the genetic map of South-West Asia based on genome-wide autosomal data.....	6
<i>Margaryan A.V.</i> About the interaction between cerebellar cortex and medial reticular formation.....	10
<i>Harutyunyan M.J., Shahinyan L.V., Khachatryan T.L., Nanagulyan S.G.</i> The degree of dependence of the grapevine, infected with powdery mildew and downy mildew, from fertilizers.....	14
<i>Khachatryan G.E., Simonyan N.V., Mkrtchyan N.I., Arakelyan V.B., Tatikyan S.Sh., Tsakanov V.M., Antonyan P.M., Karamyan S.K., Harutyunyan V.V.</i> The modeling of space biology certain problems in earth conditions.....	21
<i>Dyukova K.G., Izmailyan M.S., Manukyan L.S., Kochikyan W.T.</i> Isolation, purification and characterization of inulinase from jerusalem artichoke tubers (<i>Helianthus tuberosus</i>)	30
<i>Kotsinyan A.R.</i> Phylogeny of African swine fever virus (ASFV) based on a comparative analysis and Bayesian inference of some proteins.....	38
<i>Topuzyan V.O., Khachatryan T.S.</i> The role of choline ethers of N-substituted- α , β -dehydroaminoacids in correction of the syndrome of low triiodothyronine under hemisection of spinal cord at rats.....	49
<i>Saponjian Y.H.</i> Incessant cycles of dystrophic myofiber degeneration and regeneration result in ubiquitous centrally-nucleated fibers in skeletal muscles of X-chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) mouse.....	56
<i>Manukian K.H., Stepanian H.A., Levonian K.L., Kazarian T.I., Kirakosian L.G.</i> Characteristic features of protein and lipid components of proteolipids isolated from mitochondria cells of rat different organs.....	61
<i>Pipoyan S. Kh., Arakelyan A.S., Galstyan L.G., Gabayan I.S.</i> Fish ladders of small hydropower plants and their importance for protection of fish stocks in the rivers of basin r. Debed.....	69
<i>Mnatsakanyan N.S., Trchounian A.H.</i> Disinfecting properties of the nanocomposite filter based on a tuff porous mineral and silver nanoparticles and its application for the filtration of large volumes of water	75
<i>Tsatriyan M.S.</i> The characteristics, prevalence, agricultural machinery of the <i>Myosotis arvensis</i> (L.) and its investing opportunities in the production.....	82
<i>Harutyunyan A.A., Avakimyan J.A., Stepanyan H.M.</i> Antibacterial properties of some polycyclic heterocycles based on pyrimidines and benzimidazoles.....	88
<i>Avtandilyan N.V., Karapetyan S.A., Aleksanyan K.A.</i> The relationship between arginase activity and change of polyamines quantity in human blood serum during breast cancer.....	92
<i>Adamyany N.J.</i> Correction of some functional disorders by method of non-pharmacological treatment	100
<i>Vardanyan N. S., Sevoyan G.G., Navasardyan S.V., Vardanyan A.K., Navasardyan T.S.</i> Biohydrometallurgical treatment of tailings resulted from the beneficiation of shahumyan polymetallic ores for recovery of valuable metals.....	104



Biolog. Journal of Armenia, 2 (68), 2016

ARMENIANS ON THE GENETIC MAP OF SOUTH-WEST ASIA BASED ON GENOME-WIDE AUTOSOMAL DATA

A.A. HOVHANNISYAN

*Laboratory of Ethnogenomics, Institute of Molecular Biology, NAS RA
hovhannisyananahit19@gmail.com*

Armenians are an indigenous ethnic group historically inhabited the region in the southern Caucasus. The genetic structure of the population has been mostly tested for haploid (mitochondrial DNA and Y-chromosome) markers. Here the genetic relationships between Armenians and neighboring populations were analyzed based on genome-wide autosomal SNP typing data. Congruence between the results based on the Y-chromosomal and autosomal data was revealed, which point to the genetic isolation of Armenians from external influences during last several millennia.

Armenians – Y chromosome – SNP – population genetics

Հայերը հարավկովկասյան տարածաշրջանում պատմականորեն բնակվող տեղաբնիկ էթնիկ խումբ են: Մինչ այժմ պոպուլյացիայի գենետիկական կառուցվածքը հիմնականում հետազոտվել է հապլոիդ (միտոքոնդրիումային և Y-քրոմոսոմային) ժառանգական համակարգերի հիման վրա: Ներկա աշխատանքում ուսումնասիրվել են հայերի և հարակից պոպուլյացիաների միջև գենետիկական կապերը՝ օգտագործելով աուտոսոմային սփրինկլիկ լայնազենոմային տվյալներ: Ստացված արդյունքները վկայում են հայերի գենետիկական մեկուսացման մասին վերջին մի քանի հազարամյակների ընթացքում, ինչը միանգամայն համահունչ է Y-քրոմոսոմային և աուտոսոմային հետազոտությունների արդյունքներին:

Հայեր – Y քրոմոսոմ – SNP – պոպուլյացիոն գենետիկա

Армяне являются автохтонной этнической группой, населяющей Южно-Кавказский регион. До настоящего времени генетическая структура популяции была проанализирована в основном на основе гапloidных (митохондриальной и Y-хромосомальной) генетических систем. В работе мы исследовали генетические связи между армянами и соседними популяциями, используя данные широкогеномного аутосомального скрининга. Выявлено соответствие результатов, полученных на основе Y-хромосомальных и аутосомальных маркеров, которые указывают на генетическую изоляцию армян на протяжении последних нескольких тысячелетий.

Армяне – Y хромосома – SNP – популяционная генетика

The Armenians represent an isolated ethno-national group that speaks Armenian language, a separate branch within the Indo-European language family. The population historically occupies the area stretching from the Eastern Caucasus to Anatolia and from the Black Sea to Mesopotamia, an important region in the context of the theories of ancient human migration and language dispersal. Previous genetic studies of the Armenians confirm a significant geographic stratification of the population and identify

their mainly unadmixed pattern at least over the past 4 kya [1, 2, 3]. However, the question of the origin of Armenians still remains a subject of hot debates among scholars of various disciplines.

The impressive advances of molecular genetic technique in recent years have enabled an increasing number of applications in reconstructing of genetic history of human populations [4, 5]. Though maternally inherited mitochondrial DNA (mtDNA) and paternally transmitted non-recombining Y chromosome (NRY) variation have provided a valuable insight into human origins and migration events, however uniparental markers are limited by the content of genome information [6]. In this context, the fast-growing whole genome sequencing has become a powerful tool in population genetics.

Currently, few genome-wide association studies of Armenian population have been performed. It was shown that general Armenian population follows clustering patterns similar to the Caucasus and the Levantine ones, and did not exhibit explicit genetic affinity to other Indo-European-speaking populations [7, 8]. However, the growing number of genome-wide data from several neighboring populations requires new genetic comparisons with these datasets.

In the present study, we aim to analyze genetic relationships between the populations of South-West Asia and, in particular, to reveal the location of Armenians on the genetic landscape of the region. Based on genome-wide autosomal DNA typing data we examine genetic variation of the considered populations and compare the results obtained with those based on uniparental genetic system.

Materials and methods. The genome-wide SNP data of a total of 331 samples from 18 populations were assembled from previously published studies. The Armenian samples (n=16) [8] were compared with those of other ethnic groups – Lebanese (n=8) [9], Palestinians (n=51) [10], Jordanians (n=20) [9], Syrians (n=16) [9], Turks (n=19) [9], Kurds (n=6) [8], Iranians (n=20) [9], Azeris (n=16) [11], Georgians (n=20) [9], Abkhazians (n=20) [8], Balkars (n=19) [8], Adygeis (n=17) [10], Northern Ossetians (n=15) [8], Chechens (n=20) [8], Lezgins (n=18) [9], Kumiks (n=14) [8], Nogais (n=16) [8].

For data management and quality control we used PLINK software [12]. SNPs genotyping success rate was set to > 97% and minor allele frequency >1%. Individuals with genotyping success rate less than 97% were excluded from the analysis. After LD pruning and filtering out sex-linked and mitochondrial SNPs, the data contained 208,459 autosomal SNPs.

To study the genetic relationships of Armenians to neighboring populations, we applied Principal Component Analysis (PCA) using the *smartpca* program (EIGENSOFT package) [13].

Results and Discussion. The principal components (PCs) of autosomal variation in the considered populations are shown on the PCA plot (fig. 1). We detected a distinct cluster of Armenians, a pattern that is consistent with the previous studies reporting Armenians as a genetic isolate of the region since the end of the Bronze Age [2, 14]. The reason of the lack of significant mixture signals with surrounding populations may be explained by cultural, linguistic, and religious peculiarities of Armenians [14]. However, genetic admixtures with several Eurasian populations were detected in the Armenian gene pool between ca. 4,000 – ca. 1,000 BC [14]. This time span almost comprises the temporal extent of Bronze Age, a period characterized by mass population movements after the invention of wheel, chariots, domestication of horse, and the appearance of powerful states in the West Asia [15, 16]. These events explain the reason of considerable genetic sharing of the modern Armenian population with ancient European agriculturalists, thus pointing to the possible routes of Neolithic farmers from the Near East via the Armenian Highland to Europe and the North Caucasus [3, 17].

On the whole, the PCA analysis places the studied populations along the South-North geographic axis. Notable that Armenians are located between the populations of the Near East and the Caucasus that coincides with the published results based on Y-chromosomal markers [3]. We observe that the populations of the North Caucasus appear relatively far from other populations and form a tight cluster, reflecting an isolation role of the geographic barrier: the Greater Caucasus mountain range. Moreover, the populations of Kurds, Turks, Azeris, and Iranians are located in close proximity to each other, flanked by Armenians.

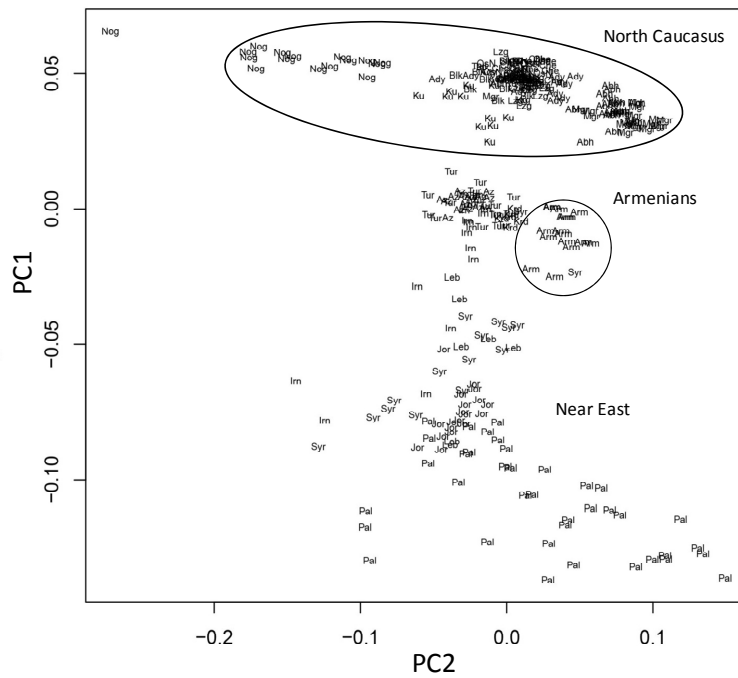


Figure 1. PCA plot based on autosomal SNPs frequencies in the populations studied.

In conclusion, the results of our study have shown that Armenians are genetically isolated in the South-West Asian region. Moreover, we found an agreement between the results based on biparentally and paternally inherited systems. In particular, the comparison reveals an intermediate position of Armenians between the populations of the Near East and the South Caucasus. Further studies with sufficiently larger samples from different regions within the Armenian Highland will provide deeper insights to the genetic peculiarities of the population.

REFERENCES

1. *Herrera K, Lowery R, Hadden L, et al.* Neolithic patrilineal signals indicate that the Armenian plateau was repopulated by agriculturalists. *Eur. J. Hum. Genet.*, 20, 313-320, 2012.
2. *Hellenthal G., Busby G., Band G., et al.* A genetic atlas of human admixture history. *Science*, 343, 747-751, 2014.

3. Hovhannisyan A., Khachatryan Z., Haber M., et al. Different waves and directions of Neolithic migrations in the Armenian Highland. *Investigative genetics*, 5, 15, 2014.
4. Leslie S, Winney B, Hellenthal G, Davison D, et al. The fine-scale genetic structure of the British population. *Nature*, 519:309-314, 2015.
5. Karmin M, Saag L, Vicente M, et al. A recent bottleneck of Y chromosome diversity coincides with a global change in culture. *Genome research* . 25, 459-466, 2015.
6. Pugach I., Stoneking M. Genome-wide insights into the genetic history of human populations. *Investigative genetics*, 6, 6, 2015.
7. Haber M., Gauguier D., Youhanna S., et al. Genome-wide diversity in the Levant reveals recent structuring by culture. *PLoS Genet* . 9, e1003316, 2013.
8. Yunusbayev B., Metspalu M., Järve M., et al. The Caucasus as an asymmetric semipermeable barrier to ancient human migrations. *Mol. Biol. Evol.*, 29, 359-365, 2012.
9. Behar D., Yunusbayev B., Metspalu M., et al. The genome-wide structure of the Jewish people. *Nature*, 466, 238-242, 2010.
10. Li J, Absher D, Tang H, et al. Worldwide human relationships inferred from genome-wide patterns of variation. *Science*, 319, 1100-1104, 2008.
11. Yunusbayev B., Metspalu M., et al. The Genetic Legacy of the Expansion of Turkic-Speaking Nomads across Eurasia. *PLoS Genet.*, 11:e1005068. 2015.
12. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet.* 81, 559-575. 2007.
13. Patterson N., Price L., Reich D. Population structure and eigenanalysis. *PLoS Genet.* 2:e190, 2006.
14. Haber M, Mezzavilla M, Xue Y, Comas D, Gasparini P, Zalloua P, Tyler-Smith C. Genetic evidence for an origin of the Armenians from Bronze Age mixing of multiple populations. *Eur. J. Hum. Genet* . Oct 21. doi: 10.1038/ejhg.2015.206, 2015.
15. Anthony D. The horse, the wheel, and language: how Bronze-Age riders from the Eurasian steppes shaped the modern world. Princeton University Press, 2010.
16. Kristiansen K, Thomas B. The rise of Bronze Age society. Travels, transmissions and transformations. Cambridge University Press, 2005.
17. Allentoft M., Sikora M., Sjögren K., Rasmussen S. et al. Population genomics of Bronze Age Eurasia. *Nature*, 522, 167-172, 2015.

Received on 06.10.2015



Биол. журн. Армении, 2 (68), 2016

О ВЗАИМОДЕЙСТВИИ КОРЫ МОЗЖЕЧКА И МЕДИАЛЬНОЙ РЕТИКУЛЯРНОЙ ФОРМАЦИИ

А.В. МАРГАРЯН

Институт физиологии им. Л. А. Орбели НАН РА
anna_margaryan_1992@mail.ru

В экспериментах на препарате перфузируемого мозга лягушки исследовались внутриклеточные потенциалы нейронов медиальной ретикулярной формации (МРФ) в ответ на раздражение ипсилатеральной аурикулярной области коры мозжечка. Выявлено, что раздражение клеток Пуркинье вызывало моно- и полисинаптические тормозные потенциалы в нейронах МРФ.

Медиальная ретикулярная формация – аурикулярная область мозжечка

Գորտի պերֆուզացվող ուղեղի պատրաստուկի վրա կատարված փորձերում ուսումնասիրվել են միջակա ցանցածն գոյացության (ՄՏԳ) նեյրոնների ներքջային պոտենցիալները՝ ի պատասխան ուղեղիկի համակողմանի խողակալ շրջանի գրգռման: Հայտնաբերված է, որ Պուրկինյեի բջիջների դրդումն առաջացնում է մոնո- և պոլիսինապտիկ արգելակիչ պոտենցիալներ ՄՏԳ նեյրոններում:

Միջակա ցանցածն գոյացություն – ուղեղիկի խողակալ շրջան

In experiments on the perfused frog brainstem the intracellular potentials of neurons of the medial reticular formation (MRF) in response to stimulation of ipsilateral auricular lobe of the cerebellar cortex were studied. It was revealed that stimulation of Purkinje cells evoked mono- and polysynaptic inhibitory potentials in the MRF neurons.

Medial reticular formation – auricular lobe of cerebellum

Ретикулоспинальная система играет важную роль в медиации вестибулярных рефлексов спинного мозга у млекопитающих [10], что важно для ориентации тела при передвижении. Ряд данных указывает, что медиальная ретикулярная формация (МРФ) варолиева моста и медуллы получает входы из вестибулярной системы. Анатомо-морфологическими исследованиями обнаружено наличие волокон, начинающихся в вестибулярном ядре и оканчивающихся в pontine и медуллярной ретикулярной формации (РФ) [6]. Выявлено, что естественная стимуляция вестибулярных рецепторов способна изменить разряд медиальных ретикулярных нейронов [4, 13], а электрическая стимуляция вестибулярного нерва продуцирует вызванные потенциалы в pontomedullary РФ [5, 11, 12].

В ранее проведенных исследованиях [2] нами было изучено влияние аурикулярной области мозжечка на нейроны бульбарного вестибулярного ядерного комплекса (ВЯК). Импульсы, поступающие из вестибулярных ядер на спинальные мотонейроны, опосредуются также и через ретикулоспинальные нейроны [8, 9], а рети-

кулоспинальный тракт представляет собой наиболее древнюю цереброспинальную систему [3]. Исходя из вышеизложенного, важно изучить функциональные взаимоотношения в системе аурикулярной области мозжечка – МРФ. Если у млекопитающих были обнаружены тормозные мозжечковые влияния на нейроны РФ, то у низших позвоночных (амфибии) такие исследования отсутствуют.

В настоящей работе проведено электрофизиологическое изучение потенциалов нейронов МРФ, вызванных в ответ на раздражение аурикулярной области коры мозжечка лягушки.

Материал и методика. Эксперименты были проведены на 93 озерных лягушках (*Rana ridibunda*) по описанной нами ранее методике изолированного перфузируемого мозга [1], которых глубоко наркотизировали раствором MS – 222 (2 мг/кг). Вскрывалась грудная клетка и обнажалось сердце. Через его желудочек в дугу аорты вводилась канюля с целью перфузии раствором Рингера для холоднокровных, насыщенным карбогеном (98 % O₂ и 2 % CO₂). С дорсальной стороны вскрывался череп и обнажалась область МРФ. Электрическое раздражение передней ветви вестибулярного нерва осуществлялось посредством всасывающего электрода одиночными ударами постоянного тока (0.1–0.2 мс, 0.05–0.4 мА). Краниотомией обнажалась также дорсальная поверхность латеральной части аурикулярной области мозжечка, к которой осторожно прикладывались биполярные серебряные шариковые электроды. Для электрического раздражения указанной области применялись те же параметры тока, что и в отношении вестибулярного нерва. С целью внутриклеточного отведения потенциалов нейронов МРФ использовались сточенные стеклянные микроэлектроды, заполненные раствором 2 М лимоннокислого калия с сопротивлением 10–20 мΩ. Был выполнен компьютерный анализ данных, которые по пробегу луча осциллографа были сохранены в соответствующей базе данных компьютера для последующей их обработки посредством аналого-цифровой конвертации. Приведены среднеарифметические стандартные отклонения показателей.

Результаты и обсуждение. Зарегистрированные нейроны МРФ были идентифицированы на основании возбуждающих постсинаптических потенциалов (ВПСП) (рис. 1 А, а1, б1; Б, а1, б1) в ответ на раздражение ипсилатерального (по отношению к МРФ) вестибулярного нерва и на стимуляцию латеральной части аурикулярной зоны коры мозжечка. Раздражение коры мозжечка в 175 ретикулярных нейронах вызывало тормозные постсинаптические потенциалы (ТПСП) (рис. 1 А, а2, б2; Б, а2, б2). На основании скрытых периодов зарегистрированных нейронов МРФ ТПСП были разделены на две группы: моно- и полисинаптические (рис. 1, 2).

В 56 нейронах электрическое раздражение передней ветви вестибулярного нерва вызывало химически передаваемые ТПСП, возникающие с латенцией 1.65–3.0 мс (в ср. 2.56 ± 0.33 мс; $n=56$), (рис. 1 А, а1, б1). Время восхождения гиперполяризации до максимума равнялось в среднем 3.72 ± 0.93 мс ($2.1 - 6.15$ мс; $n=52$). Амплитуда зарегистрированных ТПСП была в пределах 0.57 – 3.3 мВ (в ср. 1.58 ± 0.58 мВ; $n=52$). Общая длительность колебалась в пределах 7.46 – 22.5 мс (в ср. 11.6 ± 3.16 ; $n=55$), (рис. 1 А, а2, б2; рис. 2). При изменении интенсивности стимуляции не наблюдалось значительных изменений в вышеотмеченных временных и амплитудных показателях, что дало основание причислить зарегистрированные ТПСП к моносинаптическим. Морфологическими и электрофизиологическими исследованиями, проведенными на млекопитающих, выявлена прямая связь мозжечка с нейронами МРФ [9], в то время как в доступной нам литературе отсутствуют данные об исследованиях, проведенных на амфибиях. Результаты наших исследований дают возможность предположить, что зарегистрированные ТПСП нейронов МРФ генерировались моносинаптически, предположительно прямой активацией аксонов клеток Пуркинье по аналогии с млекопитающими.

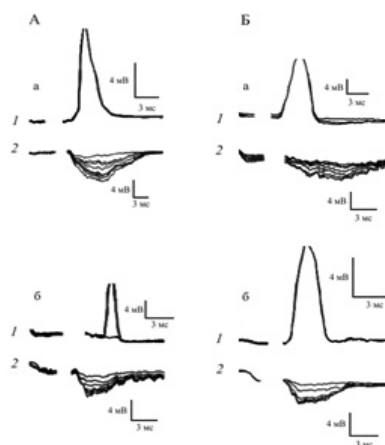


Рис. 1. Постсинаптические потенциалы четырех нейронов медиальной ретикулярной формации в ответ на раздражение ипсилатеральной аурикулярной области коры мозжечка.

А, а2, б2- моносинаптические,

Б, а2, б2- полисинаптические ТПСР при различной интенсивности стимуляции ипсилатеральной аурикулярной области коры мозжечка.

А, а1, б1; Б, а1, б1- ВПСР тех же нейронов медиальной ретикулярной формации на раздражение передней ветви вестибулярного нерва с целью их идентификации.

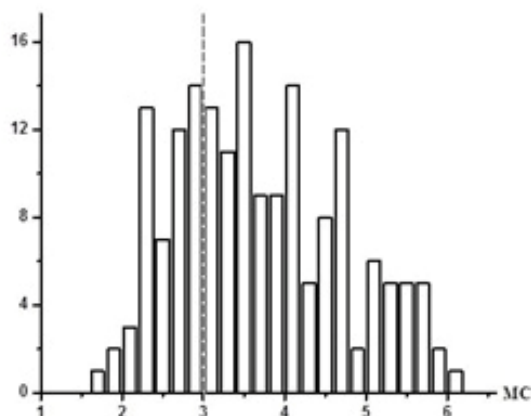


Рис. 2. Гистограмма распределения моно- и полисинаптических ТПСР нейронов медиальной ретикулярной формации в ответ на раздражение ипсилатеральной аурикулярной области коры мозжечка.

Прерывистая линия разделяет моно- и полисинаптические ответы.

По оси абсцисс – время (мс); по оси ординат – количество исследованных нейронов (n).

В ответ на раздражение аурикулярной области коры мозжечка в 119 нейронах МРФ были зарегистрированы ТПСР с более длительным и нестабильным скрытым периодом (рис. 1 Б, а2, б2; рис.2). При увеличении интенсивности стимуляции имело место укорочение скрытых периодов и времени нарастания ТПСР. Их скрытый период колебался в пределах 3.04-6.0 мс (в ср. 4.2 ± 0.8 мс; $n=119$). Время нарастания амплитуды до максимума составляло 2.22-8.0 мс (в ср. 5.16 ± 1.24 мс; $n=87$).

Амплитуда исследуемых нейронов находилась в пределах 0.63- 3.5 мВ (в ср. 1.8 ± 0.62 мВ; $n=92$). Общая длительность отмеченных ТПСП была в пределах 8.18-27.8 мс (в ср. 15.5 ± 4.6 мс; $n=112$) (рис. 1 Б, а1, б1; рис. 2). Описанные временные характеристики зарегистрированных ТПСП указывают на их ди- и полисинаптическую природу происхождения.

Можно сделать предположение, что вышеописанные полисинаптические ТПСП имели место не прямой, а косвенной активацией клеток Пуркинье через параллельные волокна, схожими с таковыми, зарегистрированными в ВЯК при раздражении аурикулярной области коры мозжечка. Скрытые периоды зарегистрированных ТПСП зависят не только от интенсивности стимуляции, но и от относительной локализации стимулирующего электрода. В пользу последнего говорит и то, что при незначительном перемещении раздражающего электрода некоторые вестибулярные нейроны, причисленные к моносинаптическим, отвечали полисинаптически. Частота зарегистрированных ТПСП снижалась при перемещении раздражающего электрода ближе к средней линии мозжечка [7]. Можно полагать, что вышеописанный механизм мозжечково-вестибулярных влияний действует и в отношении мозжечково- ретикулярных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Манвелян Л.Р., Насоян А.М., Терзян Д.О. О влиянии мозжечка на электрическую активность нейронов вестибулярного ядерного комплекса лягушки. Докл. Академии наук, 111, 3. сс. 300-307, 2011.
2. Манвелян Л. Р., Насоян А. М., Терзян Д. О. О некоторых особенностях влияния коры мозжечка на деятельность вестибулярного ядерного комплекса лягушки. В сб.: Физиологические механизмы регуляции деятельности организма. Межд. юбил. конф., посвящ. 130-летию акад. Л. А. Орбели, изд. "Титутюн", Ереван, сс. 189-194, 2012.
3. Шаповалов А.И. Нейроны и синапсы супраспинальных моторных систем. Изд. "Наука", Л., 1975.
4. Duensing F., Schaefer K. P. Die Aktivität einzelner Neurone der Formatio reticularis des nicht gefesselten Kaninchens bei Kopfwendungen und vestibulären Reizen. Arch. Psychiatr. Neurol., 201, 1, p. 97-112, 1960.
5. Gernandt B.E., Iranyi M., Livingston, R.B. Vestibular influences on spinal mechanisms. Exp. Neurol., 1, p. 248-273, 1959.
6. Ladplin R., Brodal A. Experimental studies of commissural and reticular formation projections from the vestibular nuclei in the cat. Brain Res., 1968.
7. Magherini P.C., Giretti M.L., Precht W. Cerebellar Control of Vestibular Neurons of the frog. Arch., 356, p. 99-109, 1975.
8. Orlovsky G.N., Delyagina T.G., Wallen P. Vestibular control of swimming in lamprey. Brain Res., 90, 3, p. 479-488, 1992.
9. Rovainen C.M., Johnson P.A., Roach E.S., Monkovsky J.A. Projections of individual axons in lamprey spinal cord determinate by tracing through serial sections. J. Comp. Neurol., 149, 2, p. 193-202, 1973.
10. Rovainen C.M. Electrophysiology of vestibulospinal and vestibuloreticulospinal systems in lampreys. J. Neurophysiol., 42, p. 745-766, 1979.
11. Shimazu H., Precht W. Tonic and kinetic responses of cats vestibular neurons to horizontal angular acceleration. J. Neurophysiol., 28, p. 991-1013, 1965.
12. Shimazu H., Precht W. Inhibition of central vestibular neurons from the contralateral labyrinth and its mediating pathway. J. Neurophysiol., 29, 3, p. 467-492, 1966.
13. Spyer K. M., Chelarducci B., Pompeiano O. Gravity responses of neurons in main reticular formation. J. Neurophysiol., 37, 4, p. 705-721, 1974.

Поступила 03.02.2016



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 2(68), 2016

**ԽԱՂՈՂԻ ՎԱՅԻ ՕԻԴԻՈՒՄ ԵՎ ՄԻԼԴՅՈՒ ՍՆԿԱՅԻՆ
ՀԻՎԱՆԴՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐՈՎ ՎԱՐԱԿՄԱՆ ԱՍՏԻՃԱՆԻ
ԿԱԿՎԱԾՈՒԹՅՈՒՆԸ ՊԱՐԱՐՏԱՑՈՒՄԻՑ**

**Մ.Ժ. ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ^{1, 2}, ԼՎ. ՇԱՀԻՆՅԱՆ²,
Տ.Լ. ԽԱՉԱՏՐՅԱՆ², Ս.Գ. ՆԱՆԱԳՅՈՒՆՅԱՆ¹**

¹Երևանի պետական համալսարան, բուսաբանության և սնկաբանության ամբիոն

²Երևանի «Արարատ» Կոնյակի-Գինու-Օղու կոմբինատ ԲԲԸ,
info@noy1877.am

Ուսումնասիրվել է կոնյակի գինեկույթի համար մթերվող խաղողի Կանգուն, Ռկաժիթելի, Մեղրաբույր սորտերի ողկույզների վարակվածության աստիճանը, ստացված քաղցունների, պատրաստված կոնյակի գինեկույթի որակական և քանակական կազմը՝ կախված կիրառված տարբեր հանքային պարարտանյութերի համակցություններից և չափաքանակներից: Հետազոտության արդյունքները փաստում են, որ օիդիում և միլդյու սնկային հիվանդություններով խաղողի պտուղների վարակվածության վրա տարբեր պարարտացումներ տարբեր կերպ են անդրադառնում: Խաղողի պտուղների ազդեցություն ունեն PK երկկողմանի և NPK եռակողմ պարարտացումները, որոնք բնութագրվել են պտուղների վարակվածության ցածր բալերով: Հարկ է նշել, որ PK երկկողմանի պարարտացման դեպքում վարակված խաղողի պտուղներն ամենաշատն են պահպանում իրենց տեխնոլոգիական արժեքը, իսկ քաղցուի ելանքի տեսանկյունից ավելի դրական ազդեցություն ունեն NPK պարարտացումները:

Խաղող – օիդիում և միլդյու սնկային հիվանդություններ – պարարտացում – կոնյակի գինեկույթ

Исследовалась степень зараженности гроздей различных сортов винограда (Кангун, Ркацителли, Меграбуыр) с применением разных количеств комбинированных минеральных удобрений, а также их воздействие на качественный и количественный состав полученного сусла и коньячных виноматериалов. Результаты показали, что на зараженные грибами оидиумом и милдью ягоды винограда различные удобрения влияют по-разному. Особенно благоприятно использование двустороннего (PK) и трехстороннего (NPK) удобрений, которые характеризуются низким баллом зараженности ягод. Следует отметить, что в случае применения двустороннего удобрения (PK) зараженные ягоды винограда лучше сохраняют свою технологическую ценность, а на выход сусла положительно влияет использование трехстороннего (NPK) удобрения.

Виноград – грибковые болезни оидиум и милдью – удобрения – коньячный виноматериал

The infection degree of clusters of Rkatsiteli, Kangun and Meghrabuyr sorts of grapes made as wine materials for brandy as well as the qualitative and quantitative value of wine material depending of the combination and quantity of used fertilization were investigated. The results of the research have shown that grapes, infected with oidium and mildew diseases, have different effects from different fertilization, especially PK bilateral, NPK trilateral fertilizations have positive influence which was described with the low degree of clusters infection. Though grape clusters infected by PK bilateral fertilizations carry their technological value longer, the NPK have a positive impact from the perspective of wort.

Grapevine – oidium and mildew fungal diseases – fertilization – wine material for brandy

Հայաստանի կլիմայական պայմաններում խաղողի վազը տուժում է մի շարք սնկային հիվանդություններից, որոնցից առավել մեծ վնաս են հասցնում միլդյու և օիդիում հիվանդությունները, ավելի քիչ անտրաքնոզը, մոխրագույն փտումը և մի շարք այլ հիվանդություններ: Հիվանդության հարուցիչները ձմեռում են վարակված շիվերի վրա, որոնք լավ դիմանալով ձմռան ցրտերին գարնանը նորից վարակի աղբյուր են հանդիսանում:

Միլդյուն, որի ժողովրդական անվանումներն են «չոռ» – Արարատյան հարթավայրում, «կարմրուկ» – հյուսիս-արևելյան շրջաններում, «խորշուկ» – Մեղրու և Գորիսի շրջաններում, տարածված և ամենավտանգավոր սնկային հիվանդությունն է: Խաղողի ողկույզը միլդյունով վարակվում է պտղի ձևավորման վաղ շրջանից մինչև հասունացման սկիզբը: Պտղի ձևավորման վաղ շրջանում ողկույզը ստանում է կանաչադեղնավուն երանգ, ավելի ուշ վարակվելու դեպքում հիվանդ պտուղները գորշ կապտավուն են, հիմքից չմշկվում և թեթև շարժումից թափվում են: Հաճախ միլդյունով վարակվում է նաև ողկույզի կոթունը: Վարակման հատվածում առաջանում են գորշ գույնի բծեր, որոնք հետզհետե չորանաում են, թեթև շարժումից ողկույզը կոտրվում և պոկվում է վազից [1, 2, 4, 8]:

Սնկային հիվանդություններից երկրորդ տեղը իր վտանգավորությամբ գրավում է օիդիումը, որին Արարատյան գոգահովտի այգեգործական շրջաններում անվանում են «սև», իսկ հյուսիսային շրջաններում «թոզ»: Օիդիումը հատկապես վտանգավոր է երբ զարգանում է ծաղկաբույլերի և պտուղների վրա: Այն ողկույզների վրա նկատվում է պտղի զարգացման սկզբից մինչև հասունացումը: Վարակը սկզբում նկատվում է առանձին պտուղների վրա, իսկ հիվանդության զարգացման նպաստավոր պայմաններում տարածվում է ամբողջ ողկույզով: Եթե պտուղը օիդիումով վարակվում է ձևավորման վաղ շրջանում, ապա աճը կանգ է առնում, պտուղը այլևս չի մեծանում, գորշանում է, կարծրանում և չորանում: Ավելի ուշ վարակվելու դեպքում կանգ է առնում միայն պտղամաշկի աճը, որի բջիջները կորցնում են իրենց առաձգականությունը: Հետագայում պտղամաշկը պատռվում է, ճեղքից պարզ երևում են մերկացած կորիզները: Խոնավ պայմաններում ճեղքված պտուղներն արագ փտում են [2, 11]:

Հաստատված է, որ օիդիումով վարակումը, դրա զարգացման արագությունը և սնկամարմինների տարածումը վարակված օրգանների վրա կախված է օդի խոնավությունից և ջերմաստիճանից, պտուղների և տերևների ֆիզիոլոգիական վիճակից, ինչպես նաև սորտի կայունությունից [3]:

Պարարտացումը էապես ազդում է բույսերի հիվանդություններով վարակվածության վրա: Օրինակ, հողում ազոտի բարձր պարունակությունը, հատկապես, եթե այն առկա է հեշտ յուրացվող ձևով, բարձրացնում է բույսի պայթոգենների նկատմամբ ընկալողունակությունը: Բազմաթիվ մակաբույծ-սնկեր ավելի լավ են զարգանում հզոր վեգետատիվ զանգվածի վրա: Այդ պատճառով մեծ չափաքանակներով գոմաղբն ու հանքային ազոտական պարարտանյութերը նպաստում են սնկային հիվանդությունների զարգացմանը: Կալիումական և ֆոսֆորական պարարտանյութերը բարձրացնում են բույսերի կայունությունը հիվանդության հարուցիչների նկատմամբ: Միկրոտարրերը, ակտիվացնելով բույսերի նյութափոխանակությունը, նույնպես դրական են ազդում պայթոգենների նկատմամբ կայունության վրա: Այսպիսով, պարարտանյութերը բույսերի պաշտպանության միջոցներ չեն հանդիսանում, սակայն կարող են բարձրացնել նրանց կայունությունը հիվանդությունների նկատմամբ [10]:

Վերջին 20-30 տարիների ընթացքում խաղողի այգիներում հիմնականում կիրառվում են միայն ազոտական հանքային պարարտանյութեր, ուստի մենք նպատակ ենք հետապնդել հետազոտել հանքային պարարտանյութերի տարբեր համակցությունների կապը սնկային հիվանդությունների հետ:

Նյութ և մեթոդ: Մեր կողմից ուսումնասիրվել է կոնյակի գինեյութի համար մթերվող խաղողի Կանգուն, Ռկածիթելի, Մեղրաբույր սորտերի ողկույզների վարակվածության աստիճանը, ստացված քաղցուների, պատրաստված կոնյակի գինեյութերի որակական և քանակական կազմը կախված կիրառված տարբեր հանքային պարարտանյութերի համակցություններից և չափաքանակներից: Հետազոտական աշխատանքներն կատարվել են 2013-2015 թթ-ի ընթացքում Արարատի մարզի Այգեգարդ համայնքի խաղողի այգիներում: Դաշտային փորձերի հիմնման և պարարտացման տարբերակների և կրկնողությունների տեղադրման ժամանակ ղեկավարվել ենք ընդունված մեթոդներով [5, 7, 9]:

Պարարտացումը կատարվել է հետևյալ սխեմայով.

1. Առանց պարարտացման (ստուգիչ)
2. N_{100} կգ/հա ազդող նյութի հաշվով
3. $P_{80}K_{100}$
4. $N_{100} P_{80}K_{100}$:

Դաշտային պայմաններում միլոյուով վարակվածության ուսումնասիրության մեթոդիկայում վարակվածության գնահատումն արտացոլվում է երեք գործոնների փոխազդեցությամբ՝ բույս, որի վրա զարգանում է մակաբույծը, մակաբույծ և շրջակա միջավայր, որտեղ աճում է խաղողի վազը [12]: Զանի որ գենետիկ օրգանների վարակվածության աստիճանը ոչ միշտ է համապատասխանում տերևների վարակվածության աստիճանին կարևոր է գնահատական տալ ողկույզների վարակվածությանը: Ողկույզների վարակվածությունը գնահատվում է բանակապես (պտուղ, չանջ) և արտահայտվում է բալերով. 1 բալ – եզակի պտուղների վարակվածություն, 2 բալ – պտուղների մինչև 5% վարակվածություն, 3 բալ – պտուղների մինչև 10% վարակվածություն (հանդիպում է պտղակոթի վարակվածություն), 4 բալ – պտուղների մինչև 25% վարակվածություն (առկա է պտղակոթի վարակվածություն), 5 բալ – պտուղների և չանջի ուժեղ վարակվածություն, ողկույզի չորացում [6]:

Ըստ Նույն մեթոդիկայի՝ գնահատվել է նաև ծաղկաբույլերի և ողկույզների օիդիումով վարակվածության աստիճանը չորս բալային համակարգով. 1 բալ – հազվադեպ բծեր (սնկային փառը չի նկատվում, կամ անգեղն աչքով թույլ նկատվել է), 2 բալ – եզակի բծեր (թույլ փառ), 3 բալ – բազմակի բծեր (խիտ փառ, կոնիդիակիրների լավ զարգացվածությամբ), 4 բալ – խիտ թաղանթային փառ:

Խաղողի և կոնյակի գինեկոթերի լաբորատոր հետազոտություններն իրականացվել են Երևանի «Արարատ» Կոնյակի-Գինու-Օղու կոմբինատ ԲԲԸ-ի գիտահետազոտական կենտրոնի լաբորատորիայում՝ համաձայն ՅՍՏ 179-99, ՅՍՏ 271-2007, ՅՍՏ 341-2011, ՅՍՏ 338-2011, ԳՕՍՏ 12280-75, ԳՕՍՏ 13193-73, ԳՕՍՏ 13194-74, ԳՕՍՏ 14138-76, ԳՕՍՏ 14139-76 (Ստանդարտների ազգային ինստիտուտ):

Արդյունքներ և քննարկում: Ուսումնասիրվող խաղողի սորտերի տնկարկներում պարզվել են միլոյու և օիդիում հիվանդություններով ողկույզների վարակվածության աստիճանը՝ կախված հանքային պարարտանյութերի երեք հարաբերակցությունների կիրառված տարբերակներից:

Աղ. 1-ի տվյալներից երևում է, որ երկու սնկային հիվանդությունների դեպքում էլ խաղողի Ռկածիթելի, Կանգուն և Մեղրաբույր սորտերից ստացված բաղցունների ելանքներն էապես զիջում են համապատասխան առողջ ու չպարարտացված տարբերակներին: Սակայն տարբեր պարարտանյութերով հիվանդ վազերի մշակումները բույսի հիվանդության վարակվածության վրա տարբեր ազդեցություն են ունեցել: Այսպես օրինակ, օիդիում հիվանդության դեպքում երեք սորտերի առանց պարարտացման ստուգիչ տարբերակներն էլ բնութագրվել են վարակվածության մեկական բալով: Նույն օրինաչափությունը պահպանվում է նաև միլոյուով վարակվածության դեպքում: Պատկերը զգալի փոխվում է միակողմանի ազդողական պարարտանյութերի կիրառման ժամանակ՝ օիդիումի դեպքում Ռկածիթելի և Կանգուն սորտերի վարակվածության աստիճաններն ամենաբարձր են 3-ական բալ:

Մեծ մասամբ ազդողական պարարտանյութերի միակողմանի օգտագործման հետևանքով վարակվածության բարձր ցուցանիշները պայմանավորված են կանաչ գանգվածի ինտենսիվ աճով, որտեղ, կախված ստվերային լայն մակերեսի հետ, սաղարթում ստեղծվում է ավելի բարձր խոնավություն: Վերջինս դրական է ազդում և օիդիում և միլոյու հիվանդություններով վարակվածության վրա: Մեղրաբույր սորտի միակողմանի՝ ազդողական պարարտացման դեպքում վարակվածության աստիճանը համեմատաբար մյուս երկու սորտերի՝ ցածր է 2 բալ, որն ըստ գրականության տվյալների կարող է կապված լինել ողկույզի և պտուղների կառուցվածքի որոշ յուրահատկություններից՝ ողկույզի խտության, պտղամաշկի հաստության, պտղամսի կազմի, ներկանյութերի առկայության և խաղողի շաքարայնության: Մասնավորապես Տետերեվնիկովա-Բաբայանը նշում է, որ թույլ վարակվում են սևապտուղ սորտերը՝ առկա ներկանյութերի և դաբաղային նյութերի համեմատաբար բարձր պարունակության շնորհիվ, ինչպես նաև հաստ, կոպիտ պտղամաշկ ունեցող սորտերը [11]:

Խաղողի Ռկածիթելի, Կանգուն և Մեղրաբույր սորտերի վերը նշված պարարտացման տարբերակներում միլոյուով վարակման աստիճանները ևս տարբերվում են միմյանցից: Ինչպես օիդիումի, միլոյուի դեպքում ևս ամենաբարձր աստիճանի վարակվածություն նկատվել է միակողմանի ազդողական պարարտանյութերի օգտագործման ժամանակ՝ երեք սորտերի մոտ էլ արտահայտվելով 2 բալով:

Աղյուսակ 1. Հանքային պարարտանյութերի տարբեր ֆոներում խաղողի քաղցուի ելանքն ու քիմիական ցուցանիշները միլիլիտր և օիլիումով վարակման դեպքում

Հիվանդությունը	Ցուցանիշի անվանումը	Հետազոտվող խաղողի տրոսերը														
		Ռկաժիբելի						Կանգուն				Մեղրաբույր				
		Առանց պարարտացման /առողջ/ ստուգիչ	Հիվանդ				Առանց պարարտացման /առողջ/ ստուգիչ	Հիվանդ				Առանց պարարտացման /առողջ/ ստուգիչ	Հիվանդ			
			Առանց պարարտացման	N	Առանց պարարտացման	NPK		Առանց պարարտացման	N	PK	NPK		Առանց պարարտացման	N	PK	NPK
Օլիվում	Քաղցուի ելանքը, %	55,2	44,5	40,2	46,4	48,5	56,3	47,6	45,3	48.9	50,1	64,2	46,1	44,0	53,3	55,2
	Շաքարի զանգվածային խտությունը, գ/100սմ ³	21,8	16,9	15,6	19,2	18,1	21,2	19,0	16,4	20,7	20,4	23,1	20,0	16,9	22,4	22,1
	Տիտրվող թթուների զանգվածային խտությունը, գ/դմ ³	7,6	9,0	10,7	8,8	8,6	7,1	9,9	12,1	9,0	8.8	6,9	8,3	12,7	7,9	9,2
	pH	3,5	3,1	3,2	3,3	3,3	3,5	3,3	3,2	3,3	3,4	3,6	3,4	3,3	3,5	3,3
	Վարակվածությունը, բալ	-	1	3	1	2	-	1	3	1	2	-	1	2	1	1
Միլլյու	Քաղցուի ելանքը, %	55,2	48,3	45,3	52,5	53,1	56,3	50,1	46,2	53,2	54.0	64,2	56,2	50,2	57,0	58,9
	Շաքարի զանգվածային խտությունը, գ/100սմ ³	21,8	19,1	17,2	20,3	19,8	21,2	18,7	17,6	20,1	19,8	23,1	19,2	18,8	20,3	19,6
	Տիտրվող թթուների զանգվածային խտությունը, գ/դմ ³	7,6	10,2	12,4	9,8	9,8	7,1	10,3	11,4	9,4	8,9	6,9	10,5	10,8	8,4	8,6
	pH	3,5	3,3	3,3	3,4	3,4	3,5	3,3	3,3	3,4	3,3	3,6	3,5	3,4	3,5	3,5
	Վարակվածությունը, բալ	1	1	2	1	1	-	1	2	1	1	-	1	2	1	1

Աղյուսակ 1. Հանքային պարարտանյութերի տարբեր ֆոներում խաղողի քաղցուի ելանքն ու քիմիական ցուցանիշները միլիլիտր և օիլիումով վարակման դեպքում

Մնացած բոլոր տարբերակներում միլոյուոլ ողկույզների վարակվածության աստիճանը միևնույնն է 1 բալ: Ինչպես երևում է աղ. 1-ի տվյալներից, քաղցունների ելանքը և շաքարայնությունը վարակվածության աստիճանի բարձրացման հետ մեկտեղ համապատասխանաբար նվազում են, ինչը նկատվում է և օիդիում և միլոյու հիվանդությունների դեպքում: Համեմատաբար քաղցունների բարձր ելանք են ապահովել NPK եռակողմ պարարտացման տարբերակները. օիդիում հիվանդության դեպքում՝ Ռկածիթելի՝ 48,5%, Կանգուն՝ 50,1% և Մեղրաբույր՝ 55,2%, իսկ միլոյուի դեպքում՝ Ռկածիթելի՝ 53,1%, Կանգուն՝ 54% և Մեղրաբույր՝ 58,9%: Եռակողմ պարարտացման տարբերակներին քաղցուի ելանքով զիջում են PK երկկողմանի պարարտացման տարբերակները, սակայն վերջիններս բնութագրվում են շաքարայնության ավելի բարձր և տիտրվող թթուների ավելի ցածր արժեքներով: Շաքարայնության ցուցանիշներն ուսումնասիրելիս պարզ է դառնում, որ անգամ ցածր վարակվածության դեպքում խախտվում է պտղի հասունացման բնականոն գործընթացը և ուսումնասիրվող բոլոր տարբերակները իրենց շաքարայնությամբ զիջում են ստուգիչ նմուշներին:

Աղ. 1-ի տվյալներից երևում է նաև, որ ավելի ուժեղ վարակվածության դեպքում պտուղներում հասունացման գործընթացների խախտման հետևանքով տիտրվող թթուների բանակը զգալի չի նվազում, ինչը երևում է նաև քաղցունների pH-ի ցուցանիշներից: Երկու հիվանդությունների դեպքում էլ ամենացածր շաքարայնության և ամենաբարձր տիտրվող թթուների արժեքներ գրանցվել են ազոտական միակողմանի պարարտացման տարբերակներում: Այսպես, Ռկածիթելի սորտի օիդիում հիվանդության դեպքում քաղցուի տիտրվող թթուների արժեքը 10,7 գ/դմ³ է, Կանգուն սորտինը՝ 12,1 գ/դմ³, Մեղրաբույրինը՝ 12,7 գ/դմ³, միլոյուի դեպքում՝ համապատասխանաբար 12,4 գ/դմ³, 11,4 գ/դմ³, 10,8 գ/դմ³: Հատկանշական է, որ օիդիում և միլոյու հիվանդություններով վարակվածության դեպքում առանց պարարտացման տարբերակներն իրենց որակաբանական ցուցանիշներով համեմատաբար ավելի բարձր են, քան ազոտական միակողմանի պարարտացման նմուշները: Վերջինս կրկին ապացուցում է գրականության մեջ առկա տվյալներն այն մասին, որ ազոտական պարարտանյութերով միակողմանի պարարտացումը բացասաբար է անդրադառնում խաղողի վազի հիվանդությունների դեմ կայունության վրա: Իսկ PK պարարտացման դեպքում, ընդհակառակը, բարձրանում է վազի կայունությունը, որը պարզ նկատվում է օիդիումով վարակվածության աստիճանի տվյալներից (Ռկածիթելի և Կանգուն սորտերը մեկական բալ) [10, 11]:

Մեր կողմից ուսումնասիրվել են նաև վերը նշված քաղցուններից պատրաստված կոնյակի գինեկոթերի քիմիական ցուցանիշները և համեմատականները: Աղյուսակ 2-ում ներկայացված տվյալներից կարելի է եզրակացնել, որ թեև վարակված խաղողի սորտերից պատրաստված կոնյակի գինեկոթերի որոշ նմուշներ իրենց քիմիական ցուցանիշներով համապատասխանում են ներկայացվող պահանջներին, սակայն իրենց համահոտային հատկանիշներով չեն կարող հանդիսանալ կոնյակի սպիրտի թորման համար նախատեսված հումք:

Օիդիում և միլոյու հիվանդություններով Ռկածիթելի, Կանգուն և Մեղրաբույր սորտի խաղողի տարբեր աստիճանի վարակվածությունը համապատասխանաբար ազդել է դրանցից պատրաստված կոնյակի գինեկոթերի և քիմիական և որակական ցուցանիշների վրա: Այսպես, ստուգիչի հետ համեմատած՝ բոլոր ուսումնասիրվող նմուշներում սպիրտայնության ցուցանիշները ցածր են, ինչը ոչ միայն արդյունք է խաղողի ցածր շաքարայնության, այլև սպիրտային խմորման ոչ լիարժեք գործընթացի, հիվանդածին մանրէների առկայության, մնացորդային շաքարայնության և այլն: Ամենացածր սպիրտայնությամբ աչքի են ընկել ազոտական միակողմանի պարարտանյութերով մշակված խաղողից ստացված գինեկոթերը. օիդիումի դեպքում Ռկածիթելից ստացվածը՝ 8,5 ծավ.%, այնուհետև Կանգունից՝ 8,9 ծավ.% և Նոր Մեղրաբույրի՝ 9,0 ծավ.%: Միլոյուի դեպքում այս օրինաչափությունը պահպանվում է. Ռկածիթելի՝ 9,5 ծավ.%, այնուհետև Կանգուն՝ 9,7 ծավ.% և Մեղրաբույր՝ 10,3 ծավ.%: Մնացորդային շաքարայնության ցուցանիշներից ևս պարզ է դառնում, որ միակողմանի ազոտական պարարտանյութերով մշակման դեպքում սպիրտային խմորման գործընթացը մեծ մասամբ մինչև վերջ չի ընթանում, իսկ դրա առկայությամբ տեղի են ունենում հիվանդածին մանրէների արագ զարգացում: Դրանով են պայմանավորված այս փորձանմուշների ցնդող թթուների բարձր ցուցանիշները, որոնք արդյունք են քացախաթթվային մանրէների ինտենսիվ զարգացման: Ցնդող թթուների ցածր արժեքներով հանդես են գալիս PK պարարտանյութերով մշակված տարբերակները, որոնք վարակված նմուշներից առանձնանում են նաև համեմատելի համեմատաբար բարձր ցուցանիշներով:

Աղյուսակ 2. Հանքային պարարտանյութերի տարբեր ֆոներում օիդիում և միլդյու սնկային հիվանդությամբ վարակված խաղողից ստացված գինեկոթերի քիմիական ցուցանիշները և համտեսի գնահատականները

Ցուցանիշի անվանում	Հետազոտվող կոնյակի գինեկոթերը ըստ խաղողի տրտերի														
	Ռկածիթելի					Կանգուն					Մեղրաբույր				
	Առանց պարարտացման առողջ /ստուգիչ/	Հիվանդ				Առանց պարարտացման առողջ /ստուգիչ/	Հիվանդ				Առանց պարարտացման առողջ /ստուգիչ/	Հիվանդ			
		Առանց պարարտացման	N	PK	NPK		Առանց պարարտացման	N	PK	NPK		Առանց պարարտացման	N	PK	NPK
Էթիլ սպիրտի ծավալային մաս, ծավ. %	12,0*	9,2	8,5	10,6	10,0	11,7	10,3	8,9	11,5	11,2	12,6	10,8	9,0	12,3	12,1
		10,5	9,5	11,1	10,9		10,4	9,7	11,0	10,8		10,4	10,3	11,0	10,8
Տիտրվող թթուների զանգվածային խտություն, գ/դմ³	7,3	8,8	10,5	8,6	8,3	6,9	9,6	12,0	8,8	8,4	6,6	8,0	12,2	7,7	8,9
		10,0	12,1	9,6	9,4		9,9	12,0	9,1	8,6		8,0	12,2	7,7	8,9
Ցնդող թթուների զանգվածային խտություն, գ/դմ³	0,28	0,62	1,3	0,58	0,65	0,36	0,75	1,02	0,54	0,60	0,38	0,64	0,67	0,54	0,58
		0,60	0,78	0,67	0,69		0,75	0,81	0,72	0,68		0,72	0,78	0,56	0,62
Երկաթի զանգվածային խտություն, մգ/դմ³	0,02	0,06	0,18	0,08	0,04	0,02	0,06	0,02	0,18	0,18	0,02	0,04	0,04	0,18	0,18
		0,06	0,04	0,02	0,04		0,02	0,02	0,03	0,02		0,04	0,02	0,04	0,02
Մնացորդային շաքար, գ/100սմ³	0,2	0,3	0,5	0,3	0,2	0,2	0,5	0,4	0,3	0,3	0,3	0,4	0,5	0,4	0,3
		0,4	0,3	0,2	0,3		0,3	0,2	0,3	0,4		0,4	0,4	0,3	0,3
Ընդհանուր ծծմբի երկօքսիդի զանգվածային խտություն, մգ/դմ³	10,5	18,2	26,6	18,5	20,1	11,4	18,8	21,0	17,4	16,9	9,8	17,2	19,5	16,8	17,3
		18,0	20,2	16,1	16,7		17,9	20,1	17,3	17,6		17,2	20,6	17,8	18,4
Համտեսի գնահատական, բալ	7,9	3,5	3,0	6,0	5,3	7,8	3,7	3,1	6,2	5,1	7,4	3,9	4,1	6,6	5,4
		4,8	3,8	6,4	5,8		4,9	4,0	6,5	5,5		5,0	4,2	6,9	5,8

* - համարիչում օիդիումի տվյալներն են / հայտարարում՝ միլդյուի

Ընդհանրապես հիվանդ գինեկութեղը, հատկապես օրդիումով վարակված տարբերակներն, առանձնանում են տիպիկ հոտով ծծմբաջրածնային երանգներով, համի և հետ համի ընդգծված դառնությամբ, տիպիկ թթվությամբ, համի դատարկությամբ, ինչի արդյունքում նշված տարբերակներն արժանացել են համտեսի ցածր գնահատականի:

Միակողմանի ազոտական պարարտանյութերով մշակված խաղողից ստացված փորձամուշներում ընդհանուր ծծմբի երկօքսիդի զանգվածային պարունակությունը համեմատաբար բարձր է, ինչը կարող է խաղողի հիվանդ վազերի մշակման ազդեցությունը համեմատելի արդյունք լինել: Ծծմբային թթվի բարձր ցուցանիշները հատկապես անցանկալի են կոնյակի գինեկութի թորման ժամանակ:

Այսիպիսով, հետազոտության արդյունքները փաստում են, որ օրդիում և միլոյու մակային հիվանդություններով խաղողի պտուղների վարակվածության վրա տարբեր պարարտացումներ տարբեր կերպ են անդրադառնում. հատկապես դրական ազդեցություն ունեն PK երկկողմանի և NPK եռակողմ պարարտացումները, որոնք բնութագրվել են պտուղների վարակվածության ցածր բալերով: Չնայած, որ PK երկկողմանի պարարտացման դեպքում վարակված խաղողի պտուղները ամենաշատն են պահպանում իրենց տեխնոլոգիական արժեքը, սակայն բաղցուղի ելանքի տեսանկյունից ավելի դրական ազդեցություն ունեն NPK պարարտացումները: Ընդ որում վերջիններիս պտուղների վարակվածությունը չի գերազանցում PK երկկողմանի պարարտացման դեպքում խաղողի պտուղների վարակվածության աստիճանին:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. Այվազյան Պ.Կ., Այվազյան Գ.Պ. Խաղողագործություն սելեկցիայի և ամպելոգրաֆիայի հիմունքներով, Երևան, «Սարվարդ հրատ.», 631 էջ, 2003:
2. Պետրոսյան Ֆ.Գ., Ղամբարյան Գ.Ս., Մարության Ֆ.Գ. Խաղողի վազի վնասատուներն ու հիվանդությունները, Երևան, «Հայաստան», 108 էջ, 1970:
3. Банковская М.Г. Эпифитотии оидиума винограда на юге Украины. Автореф. канд. дисс. Киев, 20 с., 1973.
4. Вердеревский Д., Войтович К. Милдью винограда. Кишинев, «Карта Молдовеняскэ», 160 с., 1970.
5. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта, М., «Агропромиздат», 351 с., 1985.
6. Недов П.Н. Новые методы фитопатологических и иммунологических исследований в виноградарстве. Кишинев, «Штиинца», 139 с., 1985.
7. Основы методики агрохимических исследований в виноградарстве, Москва, ВАСХНИЛ, ВНИИ ВВ «Магарач», 85 с., 1970.
8. Павлюченко Н.Г. Основные болезни и вредители виноградной шолки. Защита и карантин растений. М., N 4, с. 23-25, 2015.
9. Полевой опыт. Под редакцией П.Г. Найдина, М., «Колос», 328 с., 1968.
10. Попкова К.В. Общая фитопатология. М., «Дрофа», 447с., 2005.
11. Тетеревникова-Бабаян Д.Н. Оидиум виноградной лозы. Ереван, Изд. Академии наук Армянской ССР. 140 с., 1951.
12. Mueller G.M., Bills G.F., Foster M.S. Biodiversity of Fungi. Inventory and monitoring methods. Elsevier academic press., 777 p., 2004.

Ստացվել է 12.01.2016



Biol. Journal of Armenia, 2 (68), 2016

THE MODELING OF CERTAIN PROBLEMS OF SPACE BIOLOGY IN EARTH CONDITIONS

G.E. KHACHATRYAN¹, N.V. SIMONYAN¹, N.I. MKRTCHYAN¹,
V.B. ARAKELYAN², S.SH. TATIKYAN³, V.M. TSAKANOV³,
P.M. ANTONYAN⁴, S.K. KARAMYAN⁴, V.V. HARUTYUNYAN¹

¹A.I. Alikhanyan National Science Laboratory, ²Yerevan State University,

³CANDLE Synchrotron Research Institute, ⁴National Center of Oncology of MH RA
garnik@mail.yerphi.am

The paper represents some data obtained in recent years in the field of space microbiology while conducting research in conditions simulating cosmic space, as well as directly on the spacecrafts flying in near-Earth orbits. The possibility of conducting research on this topic in Armenia by efforts of a number of research teams and their preliminary achievements in related fields are reviewed.

*Space biology – extreme conditions – ionizing radiation – electron beams –
proton beams of 18 MeV – low temperature*

Հոդվածում ներկայացված են վերջին տարիներին տիեզերական մանրէաբանության ոլորտում կատարված հետազոտությունների արդյունքները, որոնք իրականացվել են ինչպես տիեզերական տարածքը մոդելավորող պայմաններում, այնպես էլ մերձերկրյա տարածքում թռչող սարքերում: Քննարկվում են Հայաստանի մի շարք գիտական կոլեկտիվներում այդ ասպարեզում հետազոտություններ կատարելու հնարավորությունները և հարակից ասպարեզներում նախնական ձեռքբերումները:

*Տիեզերական կենսաբանություն – էքստրեմալ պայմաններ – իոնիզացիոն ճառագայթներ –
էլեկտրոնային փնջեր – 18 ՄեՎ պրոտոնային փնջեր – գերցածր ջերմաստիճաններ*

В работе приведены некоторые данные последних лет, полученные в области космической микробиологии при проведении исследований в условиях, моделирующих космическое пространство, а также непосредственно на аппаратах, летающих на околоземных орбитах. Рассмотрены возможности выполнения исследований по этой теме в Армении силами ряда научных коллективов и их предварительные достижения в смежных областях.

*Космическая биология – экстремальные условия – ионизирующее излучение –
электронные пучки – пучки протонов 18 МэВ – сверхнизкие температуры*

In recent years, after a rather long break, an abrupt interest arose in the world related to space biology again. It is caused by various resurgent projects of sending expeditions to other planets of the Solar System, particularly to Mars, as well as by search for arguments in favor of extraterrestrial life – the Panspermia hypothesis. The details of biological experiments obtained in the 80s of the last century, during Soviet and American spacecraft flights, are processed and reviewed. Biological researches are conducted on board of modern spacecrafts and in ground-based laboratories, in which the

conditions on the surface of Mars and Venus are modeled and analyzed [9, 20, 31, 32].

It is important to emphasize that until recently mainly the influence of separate stress-forming extreme factors on living organisms, particularly on microorganisms, has been studied. A classic review of the study related to microorganisms' capability to live under the influence of some extreme factors separately may be considered the fundamental group work of a number of authors, under the general edition of D. Kushner, "Microbial life in extreme environments", published in 1978 [6]. It presents a detailed result of various aspect influence on microorganisms study in key stressful conditions existing on Earth and near-Earth regions: low (up to -40°C and lower) and high ($80-90^{\circ}\text{C}$ and higher) temperatures, high (up to 1000 atmosphere and higher) pressures, extreme values of pH, high concentrations of different salts, heavy metal high concentration presence, and, finally, life under irradiation by non-ionizing and ionizing radiations.

In recent years result studies are being carried out for the simultaneous effects of these factor complexes. It should be noted that despite of certain difficulties there is a close collaboration among Russia, EEC countries, USA, Japan, South Korea when performing experiments in cosmic space environments being particularly evidenced by a recent "Bion-1M" craft flight, the greater part of the researches carried out on it were devoted to the experiments related to space biology [20, 21, 32, 33]. An important focus in these studies was given to the works comprising the behavior of different microorganisms in extreme conditions. And it is quite natural. In order to understand the complex, multiple-factor processes a method of analysis has already been developed, resulting in the investigated object or process simplification. Actually, a cell cannot be taken as a simple formation, however, the unicellular microorganisms, in comparison to multicellular ones, have a number of qualities that make them an excellent model object. Firstly, the short generation time. The rapid change of generations allows identifying the effect consequences of the stressful factors under study in a short time and gain statistics. Secondly, it allows harvesting large amounts of target biomass in a short time, which is more convenient to work with. Thirdly, it is more comfortable to perform various manipulations and experiments with small-size objects.

It can be claimed that science is still on the threshold of solving many problems of space biology, the main of which being the spread of organic material and of life itself throughout the universe, and the survival: identification of the environment in which it is possible for the living organisms to be adapted (to this or that extent) to space conditions. This is evidenced both by the nature of incoming information and by publication format. Very often new information is represented in the form of reports on conferences, interviews and briefings by the leading experts of this branch [4, 20, 21, 27, 31]. Two aspects should be distinguished in this case. The first aspect is related to the travel in a spacecraft through the cosmic space, for example, for a flight to Mars. In this case the analysis of the conditions is touched upon under which living organisms safely get from one location of space to another one with a minimal damage to their life, and viability preservation over a sufficient time after the stressor exposure completion. These issues are partially solved by experiments carried out on near-Earth space stations.

However, it should be noted that near-Earth space stations like "Mir" fly at a height of only 300 km and, actually, are still within Earth atmosphere (the beginning of exosphere boundary is at a height of about 1000 km [11]), and under the protection of Earth magnetic field, extending from 60 to 100 thousands km according to various data. A more difficult task is to stay in deep space, where, as it is known, the radiation fields in cosmic space are characterized by a broad charge composition of the electrons and protons and uranium nuclei, with an energy range from tens of eV to 1018-1019 eV and the range of linear energy transfer (LET), determining the character of the local effect on

the cells and tissues of biological objects, from tenths of keV/mcm up to 103 keV/mcm [12]. Such problems require protection condition simulation which would not complicate the spacecraft output process beyond the Earth because of its heavy weight on the one hand, but would be sufficient to ensure the survival of biological objects on board of such a device for a long flight time (years) on the other hand. The second aspect is related to the transfer of biological material through the cosmic space on any "space carrier" (meteorites, comets and asteroids [13, 26, 28, 34, 35]), and the solution of some tasks on clarification of the following question: to what extent the supposed "space carriers" can contribute to such material transference (being a protection for it), and to what extent this material can be damaged in the course of such a "journey".

Such problems can be solved in the Department of Applied Physical Researches (Applied R & D Division) of A. I. Alikhanyan National Science Laboratory (Yerevan Physics Institute) (ANL-YerPhI), where a device called "measuring vacuum chamber" has already been operating for several years. It enables to simulate cosmic space conditions. In particular, to study the effects of combined exposure on solids of low-temperature, vacuum, and electron beams of varying intensity. The temperature in this chamber may be increased up to 100 °K and even lower, a vacuum of the order 10^{-3} - 10^{-4} torr can be achieved. The chamber provided with a special window that is connected to a beam transporting channel, by which the test samples may be exposed (fig. 1).

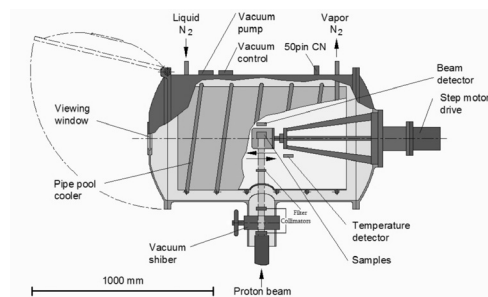


Fig. 1. The measuring vacuum chamber and communications scheme, ensuring required parameters' formation.

Thus, the basic space simulating set of conditions is provided, except for, of course, weightlessness. It should also be noted that it is possible to improve its technical parameters, if necessary, by approximating the simulation conditions closer to the "space" ones. It is assumed that a sample chamber can be installed in the experimental C-18 cyclotron hall (ANL-YerPhI), which will allow carrying out similar researches with proton beams of energies up to 18 MeV. This area of proton energy is of particular interest in biological experiments.

The main purpose of such researches is finding out the chances of terrestrial bacteria survival during their incubation in conditions maximum similar to space, and the detection of the consequences of experimental conditions prolonged exposure on them. There is evidence that in near space conditions, for example, various microorganisms, identified as *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. sphaericus* and *B. pumilus* are detected on the outside surface of the ISS. However, at the same time it should be emphasized that they were found "in areas with diagnosed surface pollution, possibly serving as nutrient and UV microorganism preservation media or providing "linkage" to station surface [4]. Being based on the results of a cycle of experiments carried out on ISS the Roscosmos specialists (FSUE CSRIMB) noted that "the data obtained on the ISS surface on the chemical and biological composition of cosmic dust allows us to suppose

the existence of "ionospheric lift" mechanism which carries out the transfer of tropospheric aerosol from the ground to the top of the ionosphere". This was confirmed by another discovery: "In areas of the VL2 MRM2 window construction, being located upstream, the fragments of DNA of Micobacteria (heterotrophic marine bacterial plankton dwelling in the Barents Sea) and the DNA of extremophilic bacteria Delftia genus were revealed in 2013. A number of facts are obtained confirming that a significant marine bacterial mass transfer to the ISS orbits is possible" [4].

It is obvious that experiments carried out in simulated conditions with variation of these factors will also provide valuable information on the chances of unicellular organisms' survival and an identification of prolonged exposure effects of these factors. This requires having organisms with clearly defined characteristics, changes of which can be easily identified. Such kind of an issue can be solved by carrying out a series of experiments on biological materials (aerobic bacteria, bacilli, facultative anaerobes), that has recently been studied at the Division of Applied R & D Division (ANL-YerPhI) by the group of Radiation biophysics. These microorganisms are selected based on their high tolerance to high concentrations of certain xenobiotics, and as it turned out, some of them possess a number of physiological and biochemical properties being quite suitable as a criteria to be used in these studies. Up to date the influence of insecticide actara on a number of cultures is most studied in details [23]. In particular, these cultures show the selective ability to grow on various nutrient media at actara concentration variation. The ability of some of them to subject a number of xenobiotics to biotransformation is of great interest as well [10, 16, 22].

The authors of this article are inclined to a long-expressed point of view that the comets are particularly promising as carriers, which are supposed to represent a set of a large amount of water ice, stones and "dirt". On the one hand such kinds of carrier are able to contribute to the biological material conservation and on the other hand they can serve as a sufficient protection against extreme factors' damaging effects and result mitigation of their impact. The actuality of this supposition in favor of comets for the scientific community is evidenced by the decision of the European Space Agency to send a special research probe Rosetta to the comet Churyumov-Gerasimenko, and the attempt to land the descending module Philae on its core. Therefore, different combinations of possible comet components (ice, gravel, sand, porous materials such as perlite and diatomite, silica gels and so on) are proposed to be taken as "space carrier" model.

The usage of porous materials can, in particular, show: to what extent the cellular material "immobilization" in the pores of the carrier may be a positive factor for survival of microorganisms in such extreme situations. Thus, it is well known that the lifetime of immobilized proteins, enzymes, some subcellular structures, and the cells themselves is far increased. At the same time the negative effects of unfavorable factors (high temperature, ionizing radiation) are reduced [3]. It is supposed to evaluate the survival of these microorganisms by the plotting of factor-effect curves and registration of possible changes in their phenotypic, morpho-physiological and biochemical characteristics after exposure to different combinations of extreme factors.

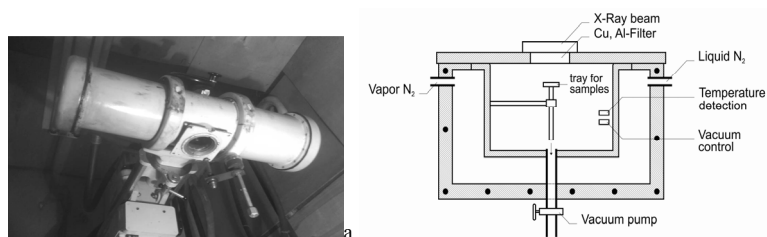


Fig.2. a – the general view of the radiating head of RUM-17; b – the scheme of top box for sample irradiation.

For this purpose it is supposed to freeze aqueous suspensions of bacteria (aerobic and facultative anaerobes) in an ice chamber in the form of a small core or bead, the size of which (about 2 cm in diameter) would be correlated to the one of the ionizing radiation beam (about 3 cm). The temperature of the manufactured ice core/bead is supposed to reduce further using liquid nitrogen. The target will be placed on a special tray in the chamber. As it was indicated above, various excipients are supposed to be used, namely: perlites, diatomites, silicagels, relatively small and large sand shingle. The duration of low temperature, vacuum, radiation exposure will vary. It is also planned to use different quality radiation, in particular, there is a source of X-rays – the unit RUM-17, at the researchers' disposal and a device similar to that shown in fig. 1 is supposed to be constructed (see. fig. 2 a, b). The target absorbed doses and beam intensities will also vary. The results will be compared with the following controls: the initial cellular materials and cells packaged into the core/bead but not subjected to vacuum and ionizing radiation, but only to low temperatures. It is as well supposed to carry out a comparison of complex factor impact results with the one of individual stress-forming factors.

Note that in the near future it will be able to conduct researches with proton beams using Cyclone-18 (with beam energy up to 18 MeV) in ANL (YerPhI). It is known that ionizing radiation is an effective source of mutations. The possibility of mutant cells obtaining, being of special interest from a practical point of view, is another area of research of this proposal having a practical consequence. From this point of view electron, proton and various accelerated ion beams are of special interest in radiobiology. The possibility of proton beam usage on Cyclone-18 is a unique opportunity to study the bacteria mutagenesis process. It is known that the efficiency of mutagenesis increases with heightening of relative biological effectiveness (RBE) of beams applied. RBE increases with linear energy transfer (LET) value increasing, which takes place at relatively low energies of particle.

There is very insufficient data in the literature on the biological effects of low-energy protons. Usually the range of energies from 25 MeV or higher was considered. This was primarily dictated by the practical needs of radiation therapy, which uses proton beams of 400 MeV and higher. To achieve the desired values of energies it is necessary to use braking devices, which leads to beam energy scattering (dissipation). The use of Cyclon-18 will allow to perform biological object irradiation under direct proton beam, at the same time the efficiency will be determined by two factors: a sufficient proton particle path length in water equivalent medium and high value of LET (about 5 KeV/mcm), resulting to a significant biological medium ionization. The data below presents the yield of mutant cells for the accelerated ion beams in the bacteria *E. coli*, which are often used in model experiments [8]. Note, that the proton irradiation with 25 MeV energy leads to significantly large changes of cells (the duration of individual phases of the mitotic cycle) than when exposed to protons of higher energies [17].

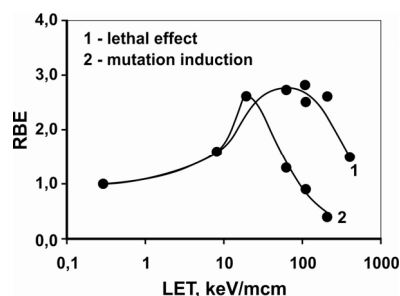


Fig.3. The dependence of RBE on LET particles based on lac- mutations induction criterion and bacteria *E. coli* lethal effects (from E.A. Krasavin work [8]).

With the decrease of proton energy a significant shift of cytogenetic and other irregularities occur towards biological effect worsening mainly associated with an increase of LET. At a value of 2 MeV LET reaches 17 keV/mcm [17].

The RBE of mutation induction, when irradiated by accelerated ions, reaches a plateau, and is rapidly approaching the maximum of lethal terminations for *E. coli* cells (fig 3). It is expected that the use of proton beam energy of 10 to 18 MeV will allow avoiding any ambiguity caused by the dissipation because of the need to inhibit the beams with higher energies, to achieve the desired ones in the target area. Thus, by conducting a purely research work we will have a chance to solve a practical problem as well: to obtain microorganism cultures with increased target activity.

The group of Radiation biophysics at ANL (YerPhI) has the corresponding experience for studying the effect of ionizing and non-ionizing radiation of different quality (X-rays, gamma rays, electron beams, alpha particles, accelerated carbon ions, as well as UV and laser radiation) on microorganisms of various genesis (yeasts, bacteria, bacilli) [1, 14, 15]. In addition, the laboratory conducted a study of the simultaneous exposure of different quality radiation on cells, and mechanisms of a combined radiation action, leading to a particular modification of cell viability of different genotypes. It should be noted that some members of the working group collaborated with the Division of Biological Research of JINR in conducting multi-aspect experiments under the general supervision of Professor E.A. Krasavin, on modeling genetic effects of radiation arising during the simulation of cosmic radiation beams by accelerated heavy ions. Also a mechanism defining the distinctions in biological efficiency of radiations, differing on LET, on the cells of a different genotype was investigated. Laboratory staff also participated in the experiments of "Genome" and "Rhythm" projects. In particular, the Yerevan Physics Institute conducted radiation experiments on *E. coli* strains of different repair genotypes by electrons and X-rays in different experimental conditions and at JINR with the same strains on heavy ion accelerator U-200 of the Laboratory of Nuclear Reactions [5, 7]. There is also experience in the study of long-term exposure of low doses on radiosensitive and radioresistant bacteria [2, 18], which can be useful for evaluating the effects of prolonged exposure to low doses of ionizing radiation on bacteria included in the cores and immobilized on porous carriers. The group also has many years of work experience on the immobilization of enzymes and cells [19, 29]. Experiments on cultured cells under fasting conditions were also carried out [24, 25].

It is necessary to note that the ANL (YerPhI) has also additional abilities for biological material irradiation. In addition, it is planned to have a close collaboration with the CANDLE Institute, which has launched a unique in its parameters AREAL accelerator that provides the ability to perform the irradiation process by different quality beams. AREAL – is a 5 MeV electron accelerator with laser driven photocathode RF gun. The schematic layout of AREAL is presented in fig. 5. AREAL is composed of electron gun with copper photocathode, mirror system for high energy UV illuminating laser, solenoid and corrector magnets, dipole magnet with spectrometer arm, diagnostic screen stations for beam profile and energy measurements, two faraday cups: internal and external for beam charge measurements. For the extraction of electron beam from the vacuum pipe two experimental stations equipped with Ti electron windows are used. The layout of the accelerator is flexible and allows a direct measurement of electron beam parameters just before the extraction. Titanium windows are separating the ultra-high vacuum environment 10^{-9} torr from the atmosphere. Nevertheless, they are transparent for the electron beam (99.9% transmission) and do not destroy the electron beam profile and energy distribution. External Faraday Cup is used to measure the extracted charge without and with sample, thus precisely estimating the sample absorbed radiation dose. Besides, the experimental measurements for specific samples FLUKA calculations are performed and compared with experimental results.

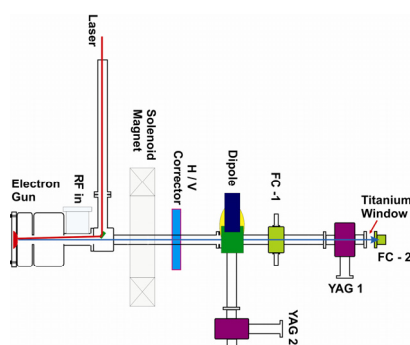


Fig.5. The schematic layout of AREAL facility.

Another advantage of the AREAL facility is the formation of electrons emitted from photocathode by means of illuminating laser. Forming and changing the main parameters of falling laser, such as transverse spot size, laser intensity/energy, pulse length, allows to generate the electron beam with main parameters similar to the laser profile ones. For other types of electron emission to form an electron beam with parameters similar to the one of AREAL additional accelerator devices, such as bunch compressors, velocity bunching cavities, etc., would be required. The main parameters are quite flexible and available to change within a range to pre-define the electron beam quality. Tabl.1 presents the characteristic parameters for AREAL electron beam. In addition to single bunch operation a new multi bunch operating mode is under development.

Table 1. Main parameters of electron beam

Parameter	Single bunch	Multi bunch
Beam energy	Up to 5 MeV	Up to 5MeV
Bunch length (FWHM)	0.4 – 9 ps	0.4 ps
Beam diameter at Ti window	2 - 10 mm	2-10 mm
Bunch charge	10-250 pC	10-20 pC
Emittance $\epsilon_{x,y}$ (mm-mrad)	< 0.35	< 0.35
Pulse repetition rate	1-50 Hz	1-50 Hz
Bunches per pulse	1	16

In result of the planned operations the new information concerning the survival of the bacteria which have, in particular, the specific physiological and biochemical properties, during the incubation in above described extreme conditions under the action of the latter in various combinations on microorganisms will be received. The rates of their growth in these conditions, the growth effects, characterizing the degree of reversibility or irreversibility of damaged cells, and their phenotypic, morphological physiological, biochemical and other characteristics will be evaluated. It is also expected to register mutant bacterial cells, including those with enhanced target activity to certain pesticides used as substrates.

It is expedient to add that the results of the proposed works may also be the basis for the solution of some radiobiological problems of medical orientation, in particular, to optimize the treatment procedures in radiotherapy during cancer treatment using the cell cultures received on the basis of tissues obtained during a biopsy for histological analyzes at National Center of Oncology. In particular, the results of this research may contribute to the development of new modes for fractionation and optimization of dose value per fraction during various tissue irradiation with revealed pathology.

All the foregoing gives grounds to assert that the ANL (YerPhI) conditions together with the technical possibilities of CANDLE will allow to perform a complex of similar activities in terrestrial conditions, to model and solve certain problems of interest to space biology.

REFERENCES

1. *Авакян Ц.М., Аджян С.А., Джанполадян Н.Л., Симонян Н.В.* Химическая защита клеток гриба *Endomycetes vernalis* от поражения электронами с энергией 50 МэВ и рентгеновскими лучами. *Studia biophysica*, Berlin, band 48, heft 2, p. 125-130, 1975.
2. *Авакян Ц.М., Мкртчян Н.И., Симонян Н.В., Хачатрян Г.Э.* Исследование биологического действия электронов с энергией 7,5 МэВ на клетки бактерий *E. coli* K12 разного репарационного генотипа. *ДАН РА*, 3, 2, с.164-170, 2011 г.
3. *Березин И.В., Клячко Н.Л., Левашов А.В.* Имобилизованные ферменты. Кн. 7 в серии Биотехнология, М., 160 с., 1987.
4. Внешняя поверхность МКС – как инструмент для исследования воздействия факторов космического пространства; http://www.tsnimash.ru/press-center/company_news/2956/sphrase_id=10598.
5. *Восканян К.Ш., Симонян Н.В., Авакян Ц.М., Авакян Г.М.* Зависимость радиозащитного действия гелий-неонового лазерного излучения на клетки бактерий от интервала времени между двумя видами облучения. М., Радиобиология, 27, вып.5, с. 708-711, 1987.
6. Жизнь микробов в экстремальных условиях, ред. Д. Кашнер, Мир, М., 1981
7. *Красавин Е.А., Амиртаев К.Г., Козубек С., Токарева Б., Симонян Н.В., Джанполадян Н.Л., Степанян Л.Г., Череватенко А.П.* Роль генотипа в протекторном влиянии цистеина и глицерина на клетки *Escherchia coli* при действии излучений с разной линейной передачей энергии. Сообщения Объединенного института ядерных исследований, P19-85-721, 1985.
8. *Красавин Е.А.* Ускорители ОИЯИ – уникальные инструменты для моделирования радиационно-генетических эффектов космических видов радиации. Сборник докладов, III Сисакяновские чтения, 30 мая – 3 июня, Ереван, Армения, с. 35-61, 2004.
9. *Ксанфомалити Л.В.* Венера как естественная лаборатория для поиска жизни в условиях высоких температур: о событиях на планете 1 марта 1982 г. *Астрономический Вестник*, 46, 1, с. 44-57, 2012.
10. *Мкртчян Н.И., Хачатрян Г.Э., Татикян С.Ш., Симонян Н.В.* Рост некоторых почвенных аэробных микроорганизмов в присутствии инсектицидов Актара и Конфидор. Биол. журн. Армении, 63, 3, с. 6-14, 2011.
11. *Парин В.В., Космолинский Ф.П., Душков Б.А.* Космическая биология и медицина (издание 2-е), М., Просвещение, 223 с., 1975.
12. *Петров В.М.* Радиационный риск в проблеме обеспечения радиационной безопасности космических полетов, в кн. Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии, Москва-Дубна, с.111-125, 2002.
13. *Розанов А.Ю.* Бактериально-палеонтологический подход к изучению метеоритов, Вестник РАН, 70, 3, с. 214-226, 2000.
14. *Симонян Н.В.* Некоторые аспекты изучения LHR у *E. coli* В после УФ-облучения. Радиобиология, М., 15, 2, с. 247-251, 1975.
15. *Симонян Н.В., Авакян Ц.М., Восканян К.Ш.* Радиозащитное действие гелий-неонового лазерного света на клетки бактерий при одновременном облучении их ионизирующим и лазерным излучениями. *Studia biophysica*, Berlin, band 116, heft 2, p. 101-106, 1986.
16. *Татикян С.Ш., Мкртчян Н.И., Симонян Н.В., Хачатрян Г.Э.* Биодegradация триазиновых гербицидов. Биол. журн. Армении, 62, 1, с. 36-42, 2010.
17. *Федоренко Б.С., Ворожцова С.В., Герасименко В.Н., Дружинин С.В., Юдаева Л.А.* Цитогенетические нарушения в клетках экспериментальных животных и человека при действии ускоренных заряженных частиц и космического излучения. Физика элем. частиц и атом. ядра, 30, 2, с. 470-522, 1999.

18. *Хачатрян Г.Э., Мкртчян Н.И., Симонян Н.В., Аракелян В.Б., Авакян Ц.М., Пюскюлян К.И., Атоян В.А.* Реакция микробиоты почвы, прилегающей к Армянской атомной электростанции, на ее воздействие. Биолог. журн. Армении, 66, 2, с. 6-12, 2014.
19. *Хачатрян Г.Э., Мкртчян Н.И., Симонян Н.В., Аракелян В.Б.* Содержание и радиочувствительность клеток бактерий *Pseudomonas* и *Bacillus* в образцах почв из участков, прилегающих к АЭС. Биолог. журн. Армении, 66, 3, с. 6-13, 2014.
20. *Alferov A.V.* Presentation at Scientific and Technical Subcommittee of UN Committee: Fifty-second session-2-13 February 2015 <http://www.unoosa.org/pdf/pres/stsc2015/tech-16E.pdf>, <http://www.unoosa.org/pdf/pres/stsc2015/tech-16R.pdf>, <http://www.nasa.gov/ames/research/space-biosciences/bion-m1>
21. XV Conference on Space Biology and Aerospace Medicine with International Participation "BION-M1 PROJECT: Results and Forward Plans" Moscow, 18-20 November, 2014; <https://asgsr.org/index.php/presentation-abstracts-10-24-2014>.
22. *Khachatryan G.E., Mkrtchyan N.I., Simonyan N.V., Khachatryan T.V., Tatikyan S.Sh.* Two Unidentified Aerobic Bacterial Strains That Transform 2,4,6-Trinitrotoluene. World J. Microbiol. Biotechnol., 16, p. 393-395, 2000.
23. *Khachatryan G.E., Mkrtchyan N.I.* Pesticide usage and environmental protection, Advances in Energy, Environment and Materials Science: proceedings of International Conference on Energy Environment and Material Science, Guangzhou, China, 25-26 July, p. 191-194, 2015.
24. *Myasnik M.N., Safiazov Z.S., Akmedova D.U., Simonian N.V., Korogodin V.I.* Growth patterns of *E.coli* in saline. Studia biophysica, Berlin, band 17, heft 2, p. 55-62, 1969.
25. *Myasnik M.N., Safiazov Z.S., Akhmedova D.U., Simonian N.V., Korogodin V.I.* Growth patterns of UV-irradiated *E.coli* B in saline. Studia biophysica, Berlin, band 17,2, p. 63-70, 1969.
26. *Napier W.M.* Exchange of biomaterial between planetary systems, Buckingham Centre for Astrobiology University of Buckingham, Buckingham MK18 1EG, http://journalofcosmology.com/JoC16pdfs/12_Napier.pdf
27. *Narlikar J.V.* I don't subscribe to the bandwagon idea of Big Bang: <http://www.livemint.com/Leisure/5BzUHIqBzqdx9dJS9netTN/I-dont-subscribe-to-the-bandwagon-idea-of-Big-Bang-Jayant.html>
28. *Sheldon R.B.* Comets, Information, and the Origin-Of-Life, Genesis – In The Beginning. The series Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology, 22, p. 363-389, 2000.
29. *Simonian A.L., Khachatryan G.E., Tatikyan S.Sh., Avakian Ts.M., Badalian I.E.* A flow-through enzyme analyzer for determination of L-lysine concentration. Biosensors and Bioelectronics, 6, 2, p. 93-99, 1991.
30. *Simonian A.L., Badalian I.E., Khachatryan G.E., Tatikyan S.Sh., Rainina E.I., Machlis T.A., Lozinsky V.I., Varfolomeev D.S.* A biosensor for L-proline determination by use of immobilized microbial cells. J. Applied Biochemistry and Biotechnology, 36, p. 199-210, 1992.
31. *Solovyova O.A., Cheptzov V.S., Vorobyova E.A., Gorlenko M.V., Polyanskaya L.M., Lapygina E.V., Pavlov A.K., Vdovina M., V.H. Lomasov* Survival of Soil and Permafrost Microbial Communities in Simulated Space and Martian Conditions, 13th European Workshop on Astrobiology – EANA'13, Szczecin, Poland. 22-25 July, 2013.
32. *Sychev V.N., Ilyin E.A., Yarmanova E.N., Rakov D.V., Ushakov I.B., Kirilin A.N., Orlov O.I., Grigoriev A.I.* The BION-M1 project: overview and first results, Aviakosm Ekolog. Med. 48, 1, 7-14, 2014; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25033609>
33. *Warmflash D., Ciftcioglu N., Fox G., McKay D. S., Friedman L., Betts B., Kirschvink J.* Living Interplanetary Flight Experiment (LIFE): An Experiment on the Survivability of Microorganisms During Interplanetary Transfer.
34. *Wickramasinghe Ch., Smith W.E.,* Convergence to panspermia. Hypothesis, 12, 1: e9, 2014, doi:10.5779/hypothesis.v12i1.358
35. *Zlobin A.E.* Tunguska Similar Impact and Origin of Life, Научно-практический журнал "Соврем. научные исследов. и инновации", <http://web.snauka.ru/en/issues/2013/12/30018>

Received on 31.03.2016



Биолог. журн. Армении, 2 (68), 2016

ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА, ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ 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 и предложены методы очистки изоферментов инулиназы из экстракта клубней топинамбура (*Helianthus tuberosus*). Показано, что два изофермента инулиназы I_1 и I_2 были очищены, из них I_1 до гомогенного состояния. В результате применения описанных методов очистки значение удельной активности ферментных препаратов I_1 и I_2 увеличилось в 21,9 и 2,48 раз, а общий выход составил 30,2 % и 20,1 % соответственно. Согласно результатам гель-фильтрации, изоферменты имеют молекулярную массу 60 кДа и 92 кДа. Полученные препараты изоинулиназы I_1 и I_2 проявляют максимальную активность в диапазоне pH 4,5 – 5,5, гидролизуют инулин и активны в отношении сахарозы.

Инулиназа – топинамбур (Helianthus tuberosus) – инулин

Նկարագրված են գետնախնձորի (*Helianthus tuberosus*) պալարների մզվածքից ստացված ինուլինազի իզոֆերմենտների մաքրման մեթոդները և ներկայացված են ուսումնասիրության արդյունքները: Ինուլինազի երկու իզոֆերմենտներ՝ I_1 և I_2 , անջատվել և մաքրվել են, ընդ որում I_1 հասցվել է հոմոգեն վիճակի: Նկարագրված մաքրման մեթոդների արդյունքում ֆերմենտային պատրաստուկների տեսակարար ակտիվությունն աճում է 21,9 և 2,48 անգամ, իսկ ակտիվության ընդհանուր ելունքը կազմում է 30,2 % և 20,1 % համապատասխանաբար: Ստացված իզոֆերմենտներն ունեն 60 կԴա և 92 կԴա մոլեկուլային զանգված և ցուցաբերում են առավելագույն ակտիվություն pH 4,5-5,5 տիրույթում: Նրանք հիդրոլիզում են ինուլին և ակտիվ են սախարոզի նկատմամբ:

Ինուլինազ – Գետնախնձոր (Helianthus tuberosus) – Ինուլին

The article presents the results of studies and methods of purification of inulinase isoenzymes from the extract of Jerusalem artichoke tubers (*Helianthus tuberosus*). It has been shown that two inulinase isoenzymes, I_1 and I_2 , were purified, and one of them, I_1 , to a homogeneous condition. As a result of the mentioned purification procedure, the value of the specific activity of preparations grows by 21,9 and 2,48 times, and the total yield makes up 30,2 % and 20,1 % respectively. According to the results of the gel filtration, the isoenzymes have a molecular weight of 60 kDa and 92 kDa, both show maximum activity in the range of pH 4.5-5.5, both hydrolyze inulin and are active towards sucrose.

Inulinase – Jerusalem artichoke (Helianthus tuberosus) – inulin

Инулиназы (2,1-β-D-фруктан фруктаногидролазы) – гидролитические ферменты, расщепляющие полифруктан-инулин и высокомолекулярные полисахари-

ды (со степенью полимеризации >10) на олигосахариды низкой степени полимеризации – фруктозу и глюкозу. Накопление инулина в подземной части некоторых растений (луковицы, клубни и корни) как резервного полисахарида определяет наличие в них и инулиназ, разлагающих инулин путем ферментативного гидролиза. Инулиназы микробного происхождения были выделены и изучены из различных источников: бактерий [7, 13, 20], дрожжей [6, 8, 14], грибов [2, 5, 18]. В последние годы опубликовано множество работ, посвященных получению, очистке и характеристике микробных инулиназ, в том числе генно-инженерных сверхпродуктивных штаммов [19]. Однако растительные инулиназы мало изучены и описаны всего в двух ранних работах [3, 12]. В первом исследовании [3] хроматографией белкового экстракта клубней топинамбура на ДЕАЕ-целлюлозе были получены три пика β -фруктофуранозидазной активности. Один из ферментов был охарактеризован как инвертаза, а два других как гидролазы А и В; последние два были абсолютно идентичны по своей способности к взаимодействию с рядом олигосахаридов и практически неактивны в отношении сахарозы, незначительно отличались по своим физическим характеристикам и способностью ингибироваться сахарозой в реакции с инулином. Три фруктофуранозидазы были разделены с помощью хроматографии на колонке с ДЕАЕ-целлюлозой от растворимого белка, извлеченного из корней одуванчика [12]. Один фермент был охарактеризован как инвертаза, два других фермента - гидролазы, которые воздействовали на инулин и ряд олигосахаридов, оба имели одинаковый рН-оптимум и К_м. Ни одна из гидролаз не ингибировалась сахарозой в реакции с инулином.

Целью данной работы являлось получение высокоочищенных препаратов инулиназ из клубней топинамбура и изучение их физико-химических свойств.

Материал и методика. В работе использовали следующие реактивы: ДЭАЭ-тойоперл 650 М и тойоперл-55F (Тоyo Soda, Япония), ДЕАЕ-целлюлоза, сефадекс G-50 (Pharmacia, Швеция), 2-меркаптоэтанол и гидроксипатит (Serva, Германия), полиэтиленгликоль 35000 (LOBA Chemie, Германия). Все остальные реактивы марки х.ч. – коммерчески доступные, производства Армении и стран СНГ. Инулин, применяемый в качестве субстрата, был получен из клубней топинамбура в лаборатории биотрансформации НПЦ “Армбиотехнология” НАН РА.

Все этапы приготовления ферментного экстракта из клубней топинамбура, ионнообменная хроматография экстракта с получением трех препаратов (I₁, I₂, I₃), представляющих собой объединенные элюаты трех пиков инулиназной активности, описаны в работе [4]. Процесс индивидуальной доочистки препаратов проводился способами, включающими следующие стадии очистки.

Ионнообменная хроматография. Колонка (25x180 мм) содержала ДЕАЕ-целлюлозу, уравновешенную буфером I (20 мМ К,Na-фосфатный буфер рН 7,0 (содержащий 5 мМ меркаптоэтанол). Элюцию проводили линейным градиентом концентрации хлористого натрия (0-1 М) в буфере I. Активные фракции собирали по 8-10 мл автоматическим коллектором “Isko” (США).

Колонка (25 x300 мм) содержала ДЭАЭ-тойоперл 650М, уравновешенный буфером I. Элюцию проводили линейным градиентом концентрации хлористого натрия (0-0,4М) в буфере I. Активные фракции собирали по 8-10 мл.

Адсорбционная хроматография. Колонка (25 x 75 мм) содержала гидроксипатит. Адсорбированные белки элюировали линейным градиентом концентрации фосфатного буфера (0-0,4 М), рН 7,0. Фракции собирали по 5 мл.

Гель-хроматография. Колонка (15 x 560 мм) содержала Sephadex G-50, уравновешенный буфером I. Элюцию проводили 0,1 М NaCl в буфере I. Фракции – по 3 мл.

Колонка (10 x 920 мм) содержала тойоперл 55F, уравновешенный буфером I. Элюцию проводили 0,1 М NaCl в буфере I. Фракции собирали по 1,45 мл. Калибровку колонки проводили, используя следующие белки: ферритин (450 кДа), каталаза (240 кДа), бычий сывороточный альбумин (67 кДа), химотрипсिनоген А (25 кДа), цитохром С (12,4 кДа).

Концентрирование осуществляли на центрифужных микрофилтрах (MWCO 10000 Amicon Ultra Centrifugal Filters. EMD Millipore. USA) центрифугированием при 3000 об/мин в течение 60 мин. Фильтрат анализировали для определения инулиназной активности.

Все работы проводили при температуре 4°C.

Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ). Чистоту полученного препарата инулиназы, выделенного и очищенного из экстракта топинамбура, изучали с помощью нативного диск-электрофореза в пластинах 7,7%-ного полиакриламидного геля (ПААГ) с системой буферов Лаемли, согласно инструкции, предложенной фирмой Фармация ("Pharmacia", Швеция) [11]. Белковые зоны выявляли кумасси бриллиантовым синим R-250.

Измерение инулиназной активности. Инулиназную активность определяли инкубированием 0,1 мл раствора фермента с инулином (1 %), растворенным в 0,2 М Na-ацетатном буфере (рН 5,0) при температуре 37°C. Количество образовавшихся редуцирующих сахаров определяли модифицированным методом Somogyi-Nelson [10, 16]. За единицу инулиназной активности принимали количество фермента, катализирующего образование 1 мкмоль фруктозы в минуту в указанных условиях.

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 бычьего сывороточного альбумина.

Выход белка контролировали последовательным измерением оптической плотности элюатов колонн при 280 нм [17].

Определение рН оптимумов. Активность ферментов измеряли при разных рН в интервале от 3,5 до 8,5, используя 1 %-ный раствор сахарозы (два буферных раствора: 0,2 М ацетатный буфер для обеспечения рН 3,5-6,0 и 0,2 М фосфатный буфер для обеспечения рН 6,5-8,5).

Для ускорения расчетов и статистической обработки получаемых результатов в работе использованы программы, разработанные на языке Гаусс 4.0

Результаты и обсуждение. В результате ионообменной хроматографии на ДЕАЕ-целлюлозе концентрированного белкового экстракта из клубней топинамбура (*Helianthus tuberosus*) нами были получены три пика инулиназной активности, что предположительно может свидетельствовать о наличии в экстракте трех изоферментов инулиназы. Объединенные элюаты предположительно трех изоферментов инулиназ разной степени очистки, гидролизующих инулин с активностью $I_1=0,0175$ Ед/мг, $I_2=0,0083$ Ед/мг, $I_3=0,00450$ Ед/мг [4] были сконцентрированы отдельно друг от друга путем осаждения при 80 % насыщения сульфатом аммония $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, диализованы против 10 объемов буфера II (2 мМ К,Na-фосфатный буфер рН=7,0 содержащий 5 мМ меркаптоэтанол) и подвергнуты дальнейшей очистке.

Выделение инулиназы I_1 проводили следующим образом. Раствор диализата I_1 хроматографировали на колонне с ДЕАЕ-целлюлозой линейным градиентом концентрации хлористого натрия (0 – 0,8 М) в фосфатном буфере I. Фракции, обладающие инулиназной активностью, объединяли ($V=28$ мл), диализовали, концентрировали в диализном мешке до минимального объема ($V=2$ мл), помещая его в сухой бисер ПЭГ- 35000, и наносили на колонку с сефадексом G-50. Элюцию проводили 0,1 М NaCl в буфере I. Активные фракции ($V=9$ мл) собирали, обессоливали и концентрировали на центрифужных микрофилтрах центрифугированием до ($V = 1,5$ мл) и наносили на колонку с тойоперл 55 F. Элюцию проводили раствором 0,1 М хлористого натрия в буфере I. Элюаты, обладающие активностью, объединяли, обессоливали и концентрировали на центрифужных микрофилтрах до ($V=0,5$ мл). Полученный таким образом препарат изофермента инулиназы I_1 исследовали на гомогенность. Результаты трех стадий очистки суммированы в табл. 1.

Основываясь на полученных результатах, можно сказать, что в результате примененных 3-х этапов очистки удельная активность изофермента инулиназы I_1 увеличилась в 21,9 раз, а выход ферментативной активности составил 30,2 %.

Таблица 1. Результаты очистки инулиназы I₁ из экстракта клубней топинамбура

Этапы	Объем, мл	Общий белок, мг	Белок, мг/мл	Удельная активность, ммоль/мг мин	Общая активность, ммоль/мин	Выход, %
ДЕАЕ- целлюлоза	28	9,184	0.328	0.049	0,450	100
Сефадекс G-50	9	0,936	0.104	0.417	0,390	86.7
Тойоперл-55F	4,35	0,127	0.029	1.072	0,136	30.2

Чистота полученного белкового препарата была проверена методом нативного диск-электрофореза в 7,7 %-ном полиакриламидном геле (рис. 1). Было показано, что в геле присутствует одна основная полоса, соответствующая активности инулиназы I₁, доказанная измерением активности фермента в кусках разрезанного геля.

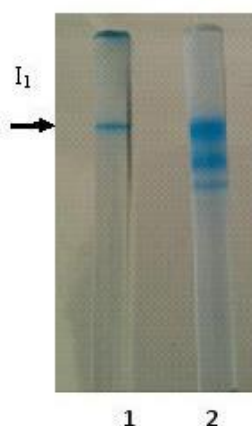


Рис. 1. Результаты нативного электрофореза препарата инулиназы I₁ из экстракта клубней топинамбура в 7,7 %-ном полиакриламидном геле: 1 – 5 мкг очищенного препарата I₁; 2 – 30 мкг препарата I₁ после хроматографии на сефадексе G-50.

Результаты определения молекулярной массы инулиназы I₁ методом гель-фильтрации на тойоперл 55 F приведены на рис. 2, из которого следует, что фермент имеет молекулярную массу ~ 60 кДа.

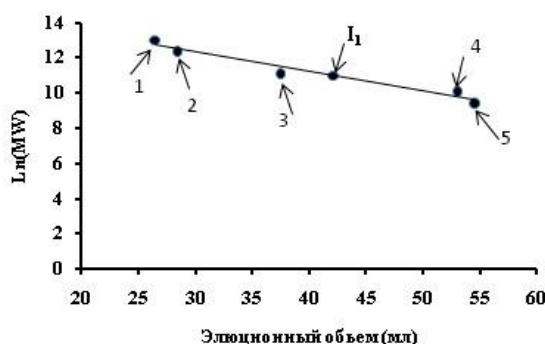


Рис. 2. Калибровочная кривая зависимости логарифмов молекулярных масс белков от величины их элюционных объемов: 1 - ферритин (450 кДа), 2 - каталаза (240 кДа), 3 - бычий сывороточный альбумин (67 кДа), 4 - химотрипсिनоген А (25 кДа), 5 - цитохром С (12,4 кДа), инулиназа I₁

Для выделения инулиназы I_2 применили иную схему очистки, которую осуществляли следующим образом. Диализат I_2 хроматографировали на колонке с ДЭАЭ-тойоперл 650 М градиентом концентрации хлористого натрия (0-0,4 М) в фосфатном буфере I. Фракции, обладающие инулиназной активностью, объединяли, упаривали на роторном испарителе под вакуумом при температуре 35°C , диализовали и наносили на колонку с гидроксиапатитом. Адсорбированные белки элюировали линейным градиентом концентрации фосфатного буфера (0-0,4 М), pH 7,0. Активные фракции объединяли, диализовали, концентрировали на центрифужных микрофилтрах центрифугированием до ($V=1$ мл) и наносили на колонку, содержащую тойоперл 55 F. Элюцию проводили раствором 0,1 М хлористого натрия в буфере I. Полученные в результате гель-фильтрации (рис. 3) элюаты фракций были объединены ($V_{28,29}=2,9$ мл), ($V_{30-34}=7,3$ мл), обессолены и сконцентрированы на центрифужных микрофилтрах центрифугированием до объемов ($V=0,5$ мл).

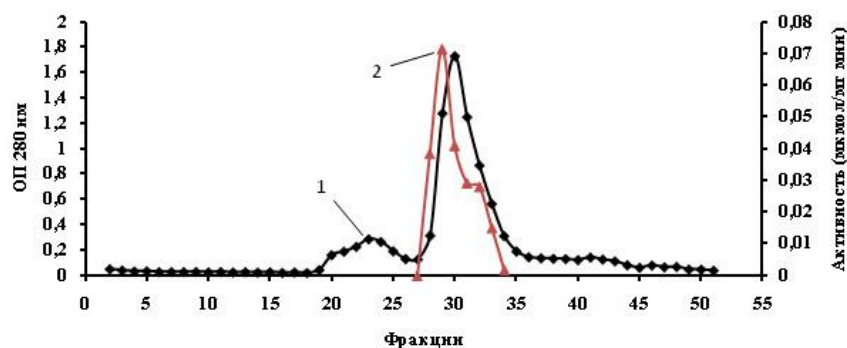


Рис. 3. Гель-фильтрация инулиназы I_2 на тойоперл – 55 F. Профили элюатов колонны: выход белка (1) и изменение инулиназной активности (2).

Препарат изофермента инулиназы I_2 представлял из себя сконцентрированный элюат фракций 28+29. В табл. 2 суммированы результаты всех перечисленных этапов.

Таблица 2. Результаты очистки инулиназы I_2 из экстракта клубней топинамбура

Этапы	Объем, мл	Общий белок, мг	Белок, мг/мл	Удельная активность, Ед/ мин	Общая активность, ммоль/мин	Выход, %
ДЭАЭ – тойоперл 650 М	180	36,0	0,2	0,0276	0,994	100
Гидроксиапатит	50	19,55	0,391	0,0442	0,864	86,9
Гель-фильтрация						
Фр. 28+29	2,9	2,93	1,01	0,0685	0,2	20,1
Фр. 30+34	7,25	5,629	0,78	0,0175	0,0985	9,9

В результате примененных 3-х этапов очистки удельная инулиназная активность I_2 возросла в 2,5 раз, а выход ферментативной активности составил ~ 20 %. Чистота полученного белкового препарата была проверена методом нативного диск-электрофореза в 7,7 %-ном полиакриламидном геле. Однако полученный препарат электрофоретически гетерогенен (рис. 4).

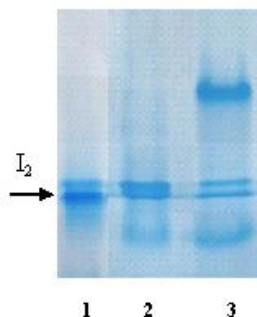


Рис. 4. Результаты нативного электрофореза препарата инулиназы I_2 в 7,7 %-ном полиакриламидном геле: 1-10 мкг очищенного препарата I_2 , 2-50 мкг препарата I_2 после хроматографии на гидроксипатите, 3-50 мкг препарата I_2 после хроматографии на ДЭАЭ – тойоперл 650 М.

Из приведенных на рис. 4 данных следует, что в геле, кроме основной полосы, соответствующей активности I_2 , доказанной измерением активности фермента в кусках разрезанного геля, присутствует еще одна минорная белковая полоса. На основании результатов, представленных в табл. 2 и рис.4 диск-электрофореза, гомогенность полученного препарата нами оценивается более чем в 80 %.

Результаты определения молекулярной массы инулиназы I_2 методом гель-фильтрации на тойоперл – 55 F приведены на рис. 5, из которого следует, что фермент имеет молекулярную массу 92 кДа.

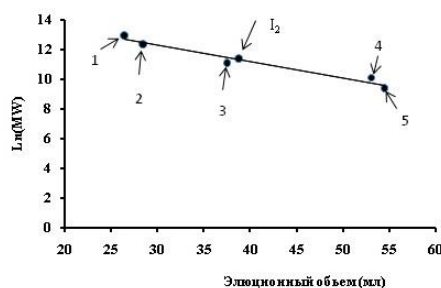


Рис. 5. Калибровочная кривая зависимости логарифмов молекулярных масс белков от величины их элюционных объемов: 1 - ферритин (450 кДа), 2 - каталаза (240 кДа), 3 - бычий сывороточный альбумин (67 кДа), 4 - химотрипсиноген А (25 кДа), 5 - цитохром С (12,4 кДа), инулиназа I_2 фракции (28+29).

Результаты экспериментов по определению рН оптимумов изоферментов инулиназы I_1 и I_2 представлены на рис. 6 и свидетельствуют о наибольшей активности белков в диапазоне рН 4,5-5,5.

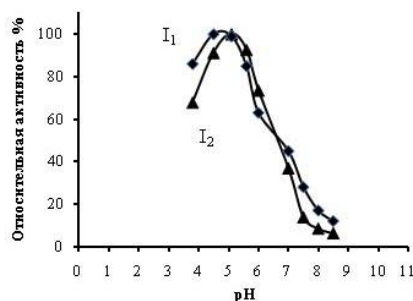


Рис. 6. Влияние рН на активность очищенных изоферментов инулиназы (I_1 , I_2) из клубней топинамбура.

Определение температурных оптимумов изоферментов инулиназы I_1 и I_2 в данной работе не проводилось, однако выявлено, что при температуре 4-5⁰ С оба изофермента продолжают гидролизовать инулин, при этом их активность в 3 раза ниже, чем при температуре 37⁰ С.

Таким образом, из экстракта клубней топинамбура (*H.tuberosus*) были выделены и очищены два изофермента инулиназы I_1 и I_2 , один из которых I_1 до гомогенного состояния. Схемы очистки для каждого фермента были подобраны индивидуально в зависимости от удельной активности исходного материала и содержания сопутствующих белков. В результате применения описанных нами методов очистки значение удельной активности ферментных препаратов I_1 и I_2 увеличилось в 21,9 и 2,48 раз, а общий выход составил 30,2 % и 20,1 % соответственно. Согласно результатам гель-фильтрации, изоферменты имеют молекулярную массу ~ 60 кДа и ~ 92 кДа. Для сравнения микробные инулиназы, выделенные из различных источников (бактерии, грибы, дрожжи), имеют молекулярную массу в диапазоне 50 ÷ 250 кДа [9, 15]. Полученные препараты изоинулиназ I_1 и I_2 проявляют максимальную активность в диапазоне рН 4,5-5,5, гидролизуют инулин и активны в отношении сахарозы.

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. Chen H.Q., Chen X.M., Chen T.X., Xu.X. M., Jin Z.Y. Extraction optimization of inulinase obtained by state fermentation of *Aspergillus ficuum* JNSP5-06, Carbohydrate Polymers, 85, p. 446-451, 2011.
3. Edelman J. and Jefford T.G. The metabolism of fructose polymers in plants. 4. B-o-fructofuranosidases of tubers of *Helianthus tuberosus* L. Biochem. J., 93, p. 148-161, 1964.
4. Дюкова К.Г., Измаилян М.С., Манукян Л.С., Кочикян В.Т. Разработка оптимальных условий выделения инулиназы из клубней топинамбура (*Helianthus tuberosus*) Биол. журн. Армении, 67, 4, 11-16, 2015.
5. Ertan F., Ekinci F., Actac T. Production of inulinases from *Penicillium spinulosum*, *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 and *Trichoderma viride*, Pakistan Journal of Biological Sciences, 150, 6, p. 1332-1335, 2003b.
6. Gong F., Zhang T., Chi Z., Sheng J., Li J., Wang X. Purification and characterization of extracellular inulinase from a marine yeast *Pichia guilliermondii* and inulin hydrolysis by purified inulinase, Biotechnology and Bioprocess Engineering, 13, p. 533-539, 2008.
7. Kang S.I., Chang Y.J., Oh S.J., Kim S.I. Purification and properties of endo-inulinase from an *Arthrobacter* sp., Biotechnology letters, 20, 10, p. 983-986, 1998.
8. Kushi R.T., Monti R., Contiero J. Production, purification and characterization of an extracellular inulinase from *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 25, p. 63-69, 2000.
9. Neagu C., Bahrum G. Inulinases – a versatile tool for biotechnology. Innovative Romanian Food Biotechnology, 9, p. 1-11, 2011.
10. Nelson N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem., 153, p. 357-380, 1944.
11. Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Laboratory Techniques), Pharmacia Fine Chemicals – Upsala, 1983.
12. Rutherford P.P. and Deacon A.C. B-fructofuranosidases from Roots of Dandelion (*Taraxacum officinale* Weber). Biochem. J., 126, p. 569-573, 1972.
13. Sharma A.D., Kainth S., Gill p.K. Inulinase production using garlic (*Allium sativum*) powder as a potential substrate in *Streptomyces* sp., Journal of Food Engineering, 77, p. 486-491, 2006.

14. Sheng J., Chi Z., Gong f., Li J. Purification and characterization of axtracellular inulinase from a marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and inulin hydrolysis by the purified inulinase, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 144, p. 111-121, 2008.
15. Singh P., Gill P.K. Production of inulinases: resent advances. *Food Technol. Biotechnol.*, 44, p. 151-162, 2006.
16. Somogyi M. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.*, 195, p. 19-23, 1952.
17. Warburg O., Christian W. Izolierung und cristallisation des Garungs-ferments endolase. *Biochem. Z.*, 310, p. 384, 1941.
18. Xiao R., Tanida M., Takao S. Inulinase from *Chrysosporum pannorum*, *Journal of Fermentation Technology*, 66, 5, p. 553-558, 1988.
19. Yu X., Guo N., Chi Z., Gong F., Sheng J., Chi Z. Inulinase overproduction by a mutant of the marine yeast *Pichia guilliermondii* using surface response methodology and inulin hydrolysis, *Biochemical Engineering Journal*, 43, p. 266-271, 2009.
20. Zhrebtsov N.A., Shelamova S.A., Abramova I.N. Biosynthesis of inulinases by *Bacillus* bacteria, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 38, 6, p. 634-638. 2002.

Поступила 11.12.2015



Биол. журн. Армении, 2 (68), 2016

ФИЛОГЕНИЯ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ, ОСНОВАННАЯ НА СРАВНИТЕЛЬНОМ АНАЛИЗЕ И БАЙЕСОВСКОМ ВЫВОДЕ ДЛЯ РЯДА ПРОТЕИНОВ

А.Р. КОЦИНЯН

Институт молекулярной биологии НАН РА
cotsinian@rambler.ru

Филогенетические взаимоотношения генотипов вируса АЧС остаются предметом дискуссий. Использование кладистического анализа по отношению к генам MGF110 12L, 13L и 14L позволило предложить гипотезу, описывающую филогенетические взаимоотношения генотипов АЧС. Основываясь на этой гипотезе, переукоренены байесовские выводы для генов MGF110 12L, MGF360 13L, A859L, D1133L и D129L 16 тотально секвенированных изолятов вируса АЧС. Показано существование двух сестринских ветвей (субклад), включающих в себя, с одной стороны, генотипы VIII, XI и X, а с другой – генотипы I, II, I/VII, IV, XX/I и V/I, каждая из которых в свою очередь делится на две субклады. Показаны некоторые несоответствия гипотезе, объяснённые возможными рекомбинационно/конверсионными событиями между генотипами.

Африканская чума свиней – молекулярная филогения – рекомбинация – конверсия

ԽԱԺ վիրուսի գենոտիպերի ֆիլոգենային հարաբերությունները դեռևս քննարկման առարկա են: MGF110 12L, 13L և 14L գեների կլադիստիկական վերլուծության միջոցով առաջարկվել է ԽԱԺ-ի գենոտիպերի փոխհարաբերության վարկած: Հիմնվելով այդ վարկածի վրա՝ վերաարմատավորվել են MGF110 12L, MGF360 13L, A859L, D1133L և D129L գեների և 16 ամբողջությամբ սեքվենավորված իզոլատների բայեսյան արտածումները: Ցույց է տրվել երկու դուստր ճյուղերի (ենթադասերի) գոյությունը, որոնք ներառում են մի կողմից՝ VIII, XI և X, մյուս կողմից՝ I, II, I/VII, IV, XX/I և V/I գենոտիպերը, որոնցից յուրաքանչյուրը, իրենց հերթին, բաժանվում են երկու ենթաճյուղերի: Ցույց է տրվել նաև անհամապատասխանություն վարկածում՝ պայմանավորված գենոտիպերում տեղի ունեցած հնարավոր ռեկոմբինացիոն/կոնվերսիոն իրադարձություններով:

Խոզերի աֆրիկական ժանտախտ – մոլեկուլային ֆիլոգենիա – ռեկոմբինացիա – կոնվերսիա

Phylogenetic relationship of ASFV genotypes remains a matter of debate. The use of cladistic analysis in relation to genes MGF110 12L, 13L and 14L allowed proposing a hypothesis describing phylogenetic relationships of ASFV genotypes. Based on that hypothesis, Bayesian inferences of genes MGF110 12L, 13L MGF360, A859L, D1133L and D129L, and 16 totally sequenced ASFV isolates have been rerooted. The existence of two sister branches (subclades) is reported, which include on the one hand the genotypes VIII, X and XI, and on the other hand the genotypes I, II, I/VII, IV, XX/I and V/I, each of which in turn is divided into two subclades. In addition, inconsistencies in the hypothesis are shown, explained by possible recombination/conversion events occurred between genotypes.

Phylogeny – molecular phylogeny – recombination – conversion

Семейство *Asfarviridae*, состоящее из монотипического рода *Asfivirus*, входит в состав группы вирусов NCLDV (Крупные ядерно-цитоплазматические ДНК-содержащие вирусы), имеющих, по-видимому, монофилетическое происхождение [9]. Вирусы африканской чумы свиней (ВАЧС) поражают свиней (*Sus scrofa*), включая домашних (*Sus scrofa domesticus*), бородавочников (*Phacochoerus*), кистеуших свиней (*Potamochoerus*) и клещей (*Argasidae*, *Ornithodoros*) [7]. ВАЧС является эндемичным к югу от Сахары вирусом, получившим распространение в Северной Америке, Западной и Восточной Европе, на Южном Кавказе и Карибах [12]. Основываясь на сравнительном анализе нуклеотидных последовательностей гена B646L (главный капсидный белок p72), кодирующих С-терминальный конец белка, выделяют 22 генотипа [2, 3]. Геномы различных генотипов по размеру варьируют от 170 до 193 т.п.н и имеют 151-167 открытых рамок считывания (ORF) [4]. Геномы ВАЧС состоят из центрального, относительно константного региона, содержащего гены метаболизма, транскрипции, репликации, репарации, морфогенеза, а также гены структурных белков. Центральный константный регион фланкирован вариабельными правыми и левым концами, содержащими гены мультигенных семейств (MGF) [8, 9]. Ключевые различия геномов ВАЧС различных генотипов связаны с композицией и расположением паралогов и ортологов MGF, с длинами tandemных повторов, уникальных для генотипов, с инсерциями и делециями, а также с концевыми инвертированными повторами (TIR) [1, 9, 11, 18]. Предположительно экспансия генов MGF даёт геномам ВАЧС селективные преимущества [15, 19]. Другим способом увеличения разнообразия вирусных геномов и, в частности, геномов ВАЧС является обмен генетическим материалом между генотипами [5, 13, 17]. В течение последних лет предпринимаемые различными авторами попытки реконструирования филогенетической гипотезы семейства *Asfarviridae* на основании сравнительного анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей генотипов ВАЧС дают отличные друг от друга результаты [8, 10, 11, 17]. Таким образом, вопросы филогенетических взаимоотношений генотипов ВАЧС остаются открытыми. Возникает ряд вопросов. На сколько характерны для геномов генотипов ВАЧС рекомбинационные или конверсионные события? Могут ли они быть причиной несоответствий в получаемых различными авторами филогенетических гипотезах? Для построения филогенетической гипотезы и её перекоренения при условии отсутствия выравниваемых с аминокислотными и нуклеотидными последовательностями генотипов ВАЧС последовательностей внешних групп, можно ли использовать последовательности генов MGF как внешнюю группу? С целью получения ответов на эти вопросы мы проанализировали ряд пространственно разнесённых в геномах ВАЧС генов и кодируемых ими аминокислотных последовательностей.

Материал и методика. Анализ последовательностей. В работе были использованы нуклеотидные последовательности генов MGF110 12L, MGF360 13L, A859L, D1133L и D129L, депонированные в GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>): (BA71V U18466 (p72 генотип I), NHV KM262845 (p72 генотип I), L60 KM262844 (p72 генотип I), E75 FN557520 (p72 генотип I), OURT88/3 AM712240 (p72 генотип I), Benin97/1 AM712239 (p72 генотип I), Mkuzi 1979 AY261362 (p72 генотип I/VII), Georgia 2007/1 FR682468 (p72 генотип II), Warmbaths AY261365 (p72 генотип III/I), Warthog AY261366 (p72 генотип IV), Pretorisuskop/96/4 AY261363 (p72 генотип XX/I), Tengan 62 AY261364 (p72 генотип V/I), Malawi Lil-20/1 AY261361 (p72 генотип VIII), Kenya 1950 AY261360 (p72 генотип X), Ken05/Tk1 KM111294 (p72 генотип X) и Ken06.Bus KM111295 (p72 генотип IX)). Трансляция нуклеотидных последовательностей в аминокислотные последовательности осуществлялась при помощи пакета программ MEGA5.2 (<http://www.megasoftware.net/>). Выравнивание аминокислотных последовательностей осуществлялось при помощи программы ClustalW, входящей в пакет программ MEGA5.2, а также вручную.

Тест на выявление рекомбинаций. Наличие рекомбинационных событий среди исследуемых последовательностей оценивалось посредством пакета программ RDP v.4.66 (Martin *et al.*, 2015). Параметры программ для выявления рекомбинационных событий внутри линейных последовательностей были использованы по умолчанию.

Реконструкция филогении. Сравнительный анализ генов MGF осуществлялся в соответствии с принципами кладистического анализа с выявлением плезиоморфных и синапоморфных состояний признаков [13]. Лучшая эволюционная модель для каждого из белков определялась при помощи пакета программ MEGA5.2. Для протеинов MGF110 12L лучшей моделью была определена модель – JTT, для MGF360 13L – JTT+G, для A859L – JTT+G, для D129L – JTT, для D1133L – JTT+G. Байесовский филогенетический вывод был осуществлён с использованием метода Монте-Карло с цепями Маркова (MCMC). Байесовский анализ аминокислотных последовательностей был осуществлён при помощи программы MrBayes v.3.1.2 (<http://mrbayes.sourceforge.net/>). Для каждого гена MCMC использовалось от 100 тысяч до 6 млн генераций до тех пор, пока стандартная девиация не становилась ниже 0,01.

Визуализация деревьев. Визуализация филогенетических деревьев осуществлялась при помощи программы FigTree v1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Результаты и обсуждение. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности лишь некоторых генов *Asfarviridae* могут быть частично выравнены с гомологичными фрагментами генов и белков вирусов родственных dsDNA семейств, таких как *Ascoviridae*, *Iridoviridae* и *Phycodnaviridae* [20]. Такая ситуация создаёт серьёзные затруднения при попытках использования последовательностей этих семейств в качестве внешних групп. Эту проблему можно обойти использованием дивергировавших от анцестральных генов паралогов мультигенных семейств (MGF) в качестве внешней группы.

MGF110 12L. Семейство MGF110 состоит из 14 паралогичных генов, количественно варьирующих от 5 у изолятов Benin 97/1 и BA71V до 12 у Mkuzi 1979 [9]. Гены MGF110 располагаются в левой варибельной части геномов ВАЧС. Сравнительный анализ нуклеотидных и соответственно аминокислотных последовательностей генов MGF110 16-ти totally секвенированных изолятов, десяти генотипов вируса ВАЧС позволил выявить индель, характерный для последовательностей MGF110 12L Georgia 2007/1, Warmbaths, Warthog, L60, E75, Benin 97/1 и Mkuzi 1979 (рис. 1А). Основываясь на принципе парсимонии, можно предположить, что этот индель является синапоморфной делецией перечисленных последовательностей. В противном случае появление этого инделя связано с множеством конвергенций, произошедших с этими последовательностями, что представляется крайне маловероятным.

На рис. 1А видна ещё одна синапоморфная делеция, определяемая как таковая по тому же принципу и объединяющая последовательности MGF110 12L L60, E75, Benin 97/1 и Mkuzi 1979, что указывает на их монофилетическое происхождение.

Таким образом, за основу определения филогенетических взаимоотношений между генотипами можно взять синапоморфную делецию последовательностей гена MGF110 12L Georgia 2007/1, Warmbaths, Warthog, L60, E75, Benin 97/1 и Mkuzi 1979. Эта синапоморфная делеция указывает на филогенетические взаимоотношения между субкладами, включающими в себя последовательности тех или иных генотипов, и позволяет проводить переукоренение филогенетического дерева. Переукоренённое филогенетическое дерево показывает, что последовательности MGF110 12L 16 изолятов ВАЧС разделяются на две основные субклады (рис. 2А).

A859L. Гены A859L кодируют геликазу и расположены в центральной константной части геномов изолятов ВАЧС. Применение алгоритма ближайшего соседа (NJ) позволило кластеризовать последовательности протеинов A859L изолятов Malawi Lil-20/1 (1983) и Kenya 1950 в одной субкладе [8]. Последовательности Warthog, Warmbaths, Tengani 62 и Pretorisuskop/96/4 образовывали субкладу с низким уровнем бутстреп поддержки, последовательности же генотипа I не образовывали их вовсе.

ФИЛОГЕНИЯ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ, ОСНОВАННАЯ НА СРАВНИТЕЛЬНОМ АНАЛИЗЕ И БАЙЕСОВСКОМ...

59 MG6 110-13L KM26284	M K V L L G - H S - V L L A H E L P D L P R Q H P P K S E L S Y W C T Y V P Q C D F C W D C Q D G I C N K N I T
Benin 9711 MG6 110-13L AM712239	M K V L L G - H S - V L L A H E L P D L P R Q H P P K S E L S Y W C T Y V P Q C D F C W D C Q D G I C N K N I T
Warthog AY261366 13L	M K V L L G - Y S - V L L A H E L P D L P R Q H P P K S E L S Y W C T Y V P Q C D F C W D C Q D G I C N K N I T
Wambaths AY261365 13L	M K V L L G - Y S - V L L A H E L P D L P R Q H P P K S E L S Y W C T Y V P Q C D F C W D C Q D G I C N K N I T
Mizuzi 1979 13L	M K V L L G - Y S - V L L A H E L P D L P R Q H P P K S E L S Y W C T Y V P Q C D F C W D C Q D G I C N K N I T
Kan057K1 KM111294 13L	M K V L P G - Y S - V L H A Y E L P D L P R Q H P P K S E L S Y W C T Y V P Q C D F C W D C Q D G I C N K N I T
Kenya 1950 AY261360 13L	M K V L L G - Y S - V L H A Y E L P D L P R Q H P P K S E L S Y W C T Y V P Q C D F C W D C Q D G I C N K N I T
Kan05 Bus KM111295 13L	M K V L L G L Y S - A L H A Y E L P D L P R Q H P P K S E L S Y W C T Y V P Q C D F C W D C Q D G I C N K N I T
Proterissupkop564 AY261363 13L	- - - - - L F - S L L A Q Q L P D L P R Q H P P K R E L K Y C T Y V P Q C D F C W D C Q N G I C N K N I T
MHV KM26284 13L-14L fusion chimera gene	M K V L L G - H S - V L L A H E L P D L P R Q H P P K S E L S Y W C T Y V P Q C D F C W D C Q D G I C N K N I T
COURT 883 AM712240 13L-14L fusion chimera gene	M K V L L G - H S - V L L A H E L P D L P R Q H P P K S E L S Y W C T Y V P Q C D F C W D C Q D G I C N K N I T
Georgia 200711 MG6 110-14L FR862468	- - - - - L L G - Y S - V L L A H E L P E L P R Q H P P K E E L P Y W C T Y V K N C D F C W D C Q N G I C N K N I T
ET5 110-14L FN65750	M K V L L G - Y S - V L L A H E L P D L S I Q H P P K E E L P Y W C T Y V K N C D F C W D C Q N G I C N K N I T
European E70 AF327839 14L	M K V L L G - Y S - V L L A H E L P D L S I Q H P P K E E L P Y W C T Y V K N C D F C W D C Q N G I C N K N I T
L60 KM26284 14L	M K V L L G - Y S - V L L A H E L P D L S I Q H P P K E E L P Y W C T Y V K N C D F C W D C Q N G I C N K N I T
Benin 9711 AM712239 14L	M K V L L G - Y S - V L L A H E L P D L S I Q H P P K E E L P Y W C T Y V K N C D F C W D C Q N G I C N K N I T
Warthog AY261366 14L	M K V L L G - Y S - V L L A H E L P E L P R Q H P P K E E L P Y W C T Y V K N C D F C W D C Q N G I C N K N I T
Wambaths AY261365 14L	M K V L L G - Y S - V L L A H E L P E L P R Q H P P K E E L P Y W C T Y V K N C D F C W D C Q N D I C N K N I T
Malawi Li-2011 (1983) AY26136 14L	M K V L L E - Y S - V L L A H E L P Y L P S R H P P K E E L P Y W C T Y V K N C D F C W D C Q N D I C N K N I T
Mizuzi 1979 AY261362 14L	M K A L L G - Y S - V L L T H E L P D L S A Q H P P K E E L Y W C T Y V K N C D F C W D C Q N D I C N K N I T
Kan057K1 KM111294 14L	M K V L L G - Y S - V L L T H E L P D L P A R H P P K E E L A Y W C T Y V K N C D F C W D C Q N D I C N K N I T
Kenya 1950 AY261360 14L	M K V L L G - Y S - V L L T H E L P D L S A Q H P P K E E L A Y W C T Y V K N C D F C W D C Q N D I C N K N I T
Kan05 Bus KM111295 14L	M K V L L G - Y S - V L L T H E L P D L P V R H P P K E E L A Y W C T Y V K N C D F C W D C Q N D I C N K N I T
Georgia 200711 MG6 110-12L FR862468	M K V F L G - Y S T I L L T Y Q S - - P T P -
Wambaths AY261365 12L	M K V F L G - Y S T I L L T Y Q S - - P A Q -
Warthog AY261366 12L	M K V F L G - Y S T I L L T Y Q S - - P A Q -
L60 KM26284 12L	M K V F L G - Y S T I L L T Y Q S - - P T Q -
ET5 FN657520 12L	M K V F L G - Y S T I L L T Y Q S - - P T Q -
Benin 9711 AM712239 12L	M K V F L G - Y S T I L L T Y Q S - - P T Q -
Mizuzi 1979 AY261362 12L	M K V F L G - Y S T I L L T Y Q S - - P T Q -
Kan05 Bus KM111295 12L	M K V F L A - Y L T I L L T Y Q T - - P T G H P P K E E L P Y W C T Y V K N C D L C W D C Q D S I Y W N K V I T
Malawi Li-2011 (1983) AY261361 12L	M K V F L G - Y S T I L L T Y Q S - - P T G H P P K E E L Y W C T A Y K S C D F C W D C Q N D T C I N K V I T
Kenya 1950 AY261360 12L	M K V F L G - F S I I L L T Y Q S - - P T G H P P K E E L A Y W C T A Y K S C D F C W D C Q N D T C I N K V I T
Kan057K1 KM111294 12L	M K V F L G - F S I I L L T Y Q S - - P T G H P P K E E L A Y W C T A Y K S C D F C W D C Q N D T C I N K V I T

A1

1	L60 MGF 110-13L KM26284	K	I	T	E	S	R	F	I	D	S	N	H	S	I	V	N	C	R	V	F	R	D	S	K	T	Q	S	L	E	S	S	M	P	H	F	S	M	E	C	L	H	P	R	Y	T	G	N	E	I	F	Q	T	W	G	C																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
2	3. Benin 97/1 MGF 110-13L AM712239	K	I	T	E	S	R	F	I	D	S	N	H	S	I	V	N	C	R	V	F	R	D	S	K	T	Q	S	L	E	S	S	M	P	H	F	S	M	E	C	L	H	P	R	Y	T	G	N	E	I	F	Q	T	W	G	C																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
3	7. Warthog AY261366 13L	K	I	T	E	S	R	F	I	D	S	N	H	S	I	V	N	C	R	V	F	R	D	S	K	T	Q	S	L	E	S	S	M	P	H	F	S	M	E	C	L	H	P	R	Y	T	G	N	E	I	F	R	T	W	G	C																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
4	3. Warmbaths AY261365 13L	K	I	A	E	S	R	F	I	D	S	N	H	S	I	V	N	C	R	V	F	R	D	S	E	T	Q	S	L	E	S	S	M	P	Y	H	N	M	E	C	S	H	P	R	P	Y	T	G	N	E	I	F	R	T	W	G	C																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
5	3. Mkuzi 1979 12L	K	I	T	E	S	R	F	I	D	S	N	H	S	I	V	N	C	R	V	F	R	N	S	K	T	Q	S	L	E	S	S	M	P	Y	H	N	M	E	C	S	H	P	R	P	Y	T	G	N	E	I	F	R	T	W	G	C																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
6	10. Ken507/1k1 KM11294 13L	K	I	T	E	S	S	R	F	I	D	S	N	H	S	I	V	N	C	R	V	F	R	D	S	R	I	Q	S	L	E	S	S	M	P	H	F	S	M	E	C	L	H	P	R	P	Y	T	G	N	E	I	F	K	P	W	G	C																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
7	11. Kenya 1950 AY261360 13L	K	I	T	G	S	R	F	I	D	S	N	H	S	I	V	N	C	R	V	F	R	D	S	K	T	Q	S	L	E	S	S	M	P	H	N	M	E	C	S	H	P	R	P	Y	T	G	N	E	I	F	K	P	W	G	C																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
8	10. Ken606 Bus KM11295 13L	K	I	T	G	S	R	F	I	D	S	N	H	S	I	V	N	C	R	V	F	R	D	S	R	T	Q	S	L	E	S	S	M	P	H	F	S	M	E	C	S	H	P	R	P	Y	T	G	N	E	I	F	K	T	W	G	C																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
9	13. Pretoriuskop964 AY261363 13L	K	I	M	E	T	Q	L	I	D	S	N	H	S	I	V	N	C	R	V	S	R	N	S	E	T	Q	T	F	E	S	S	M	P	H	S	M	E	C	S	H	P	P	Y	T	G	N	E	I	F	K	V	Y	G	C																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
10	14. NHY KM262845 13L-14L fusion chimeric gene	K	I	T	E	S	R	F	I	D	S	N	H	S	I	V	N	C	R	V	F	R	D	S	K	T	Q	S	L	E	S	V	I	P	H	S	M	E	C	S	H	P	R	P	Y	T	G	N	E	I	F	E	K	W	G	C																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
11	15. OURT 883 AM712240 13L-14L fusion chimeric gene	K	I	T	E	S	R	F	I	D	S	N	H	S	I	V	N	C	R	V	F	R	D	S	K	T	Q	S	L	E	S	V	I	P	H	S	M	E	C	S	H	P	R	P	Y	T	G	N	E	I	F	E	K	W	G	C																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
12	6. Georgia 2007/1 MGF 110-14L FR882468	K	I	T	N	E	S	I	S	M	N	-	S	I	V	N	C	I	V	N	R	N	S	-	W	G	F	E	S	V	M	P	H	N	M	E	C	S	H	P	R	P	Y	T	G	N	E	I	F	E	K	W	G	C																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
13	17. E75 110-14L FN657520	K	I	T	N	E	S	I	L	M	N	-	S	I	V	N	C	R	V	N	R	D	S	-	W	G	F	E	S	V	M	P	H	S	M	E	C	S	H	P	R	P	Y	T	G	N	E	I	F	E	K	W	G	C																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
14	10. European E70 AF237839 14L	K	I	T	N	E	S	I	L	M	N	-	S	I	V	N	C	R	V	N	R	D	S	-	W	G	F	E	S	V	M	P	H	S	M	E	C	S	H	P	R	P	Y	T	G	N	E	I	F	E	K	W	G	C																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
15	13. L60 KM262844 14L	K	I	T	N	E	S	I	L	M	N	-	S	I	V	N	C	R	V	N	R	D	S	-	W	G	F	E	S	V	M	P	H	S	M	E	C	S	H	P	R	P	Y	T	G	N	E	I	F	E	K	W	G	C																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
16	20. Benin 97/1 AM712239 14L	K	I	T	N	E	S	I	L	M	N	-	S	I	V	N	C	R	V	N	R	D	S	-	W	G	F	E	S	V	M	P	H	S	M	E	C	S	H	P	R	P	Y	T	G	N	E	I	F	E	K	W	G	C																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
17	21. Warthog AY261366 14L	K	I	T	N	E	S	I	S	M	N	-	S	I	V	N	C	I	V	N	R	N	S	-	W	G	F	E	S	V	M	P	H	N	M	E	C	S	H	P	R	P	Y	T	G	N	E	I	F	E	K	W	G	C																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
18	22. Warmbaths AY261365 14L	K	I	T	N	E	S	I	S	M	N	-	S	I	V	N	C	I	V	N	R	N	S	-	W	G	F	E	S	V	M	P	H	N	M	E	C	S	H	P	R	P	Y	T	G	N	E	I	F	E	K	W	G	C																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
19	23. Malawi Lz-2011 (1983) AY26136 14L	K	I	T	N	E	S	I	S	I	N	-	S	I	V	N	C	R	V	T	R	D	S	P	Q	S	F	E	S	V	M	P	H	S	M	E	C	S	H	P	R	P	Y	T	G	N	E	I	F	E	K	W	G	C																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
20	24. Mkuzi 1979 AY261362 14L	K	I	T	N	E	S	I	S	I	N	-	S	I	V	N	C	R	V	T	R	D	S	I	H	Q	W	F	E	S	V	M	P	H	N	M	E	C	S	H	P	R	P	Y	T	G	N	E	I	F	E	K	W	G	C																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
21	25. Ken507/1k1 KM11294 14L	K	I	T	N	E	S	I	S	I	N	-	S	I	V	N	C	R	V	T	R	D	S	I	H	Q	W	F	E	S	V	M	P	H	N	M	E	C	S	H	P	R	P	Y	T	G	N	E	I	F	E	K	W	G	C																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
22	26. Kenya 1950 AY261360 14L	K	I	T	N	E	S	I	S	I	N	-	S	I	V	N	C	R	V	T	R	D	S	I	H	Q	W	F	E	S	V	M	P	H	N	M	E	C	S	L	P	R	P	Y	T	G	N	E	I	F	E	K	W	G	C																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
23	27. Ken606 Bus KM11295 14L	K	I	T	N	E	S	I	S	I	N	-	S	I	V	N	C	R	V	T	R	D	S	I	H	Q	W	F	E	S	V	M	P	H	N	M	E	C	S	L	P	R	P	Y	T	G	N	E	I	F	E	K	W	G	C																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
24	28. Georgia 2007/1 MGF 110-12L FR882468	K	I	T	N	E	S	I	S	I	N	-	S	I	V	N	C	R	V	T	R	D	P	-	W	G	F	E	S	V	M	P	H	N	M	E	C	S	L	P	R	P	Y	T	G	N	E	I	F	E	K	W	G	C																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
25	29. Warmbaths AY261365 12L																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							</

A2.

1. L60 KM262844 MGF360-13L	LVSQ - CICYAKCMRIQIKIRVYLNKHHIEQETEDNDRTRMSEMMLNKVIQLRGYWGLN
2. Benin 97/1 AM712239 MGF360-13L	LVSQ - CICYAKCMRIQIKIRVYLNKHHIEQETEDNDRTRMSEMMLNKVIQLRGYWGLN
3. E75 FN657520 MGF360-13L	LVSQ - CICYAKCMRIQIKIRVYLNKHHIEQETEDNDRTRMSEMMLNKVIQLRGYWGLN
4. Mkuzi 1979 AY261362 MGF360-13L	LVSQ - CICYAKCMRIQIKIRVYLNKHHIEQETEDNDRTRMSEMMLNKVIQLRGYWGLN
5. Georgia 2007/1 FR602468 360-13L	LVSQ - CICYAKCMRIQIKIRVYLNKHHIEQETEDNDRTRMSEMMLNKVIQLRGYWGLN
6. Warthog AY261366 MGF360-13L	LVSQ - CTCHVKCMQIQIKIHVYLNHLEHIEQETEDNDRTKMREMNINKTQLRGCGWRLN
7. Warmbaths AY261365 MGF360-13L	LVSQ - CTCHVKCMQIQIKIHVYLNHLEHIEQETEDNDRTKMREMNINKTQLRGCGWRLN
8. Pteroniscus96/4 AY261363 MGF360-13L	LVSQ - CICHVKCMQIQIKIHVYLNHLEHIEQETEDDORTKMRDMNINKTQLRGCGWRLN
9. Tengan 62 AY261364 MGF360-13L	LVSQ - CICHVKCMQIQIKIHVYLNKHHIEQETEDDORTKMSDMNIDKTIQLRGYWGLN
10. Malawi LJ-201 (1983) AY261361 MGF360-13L	AVSTSCI - YAKYIRIYIKICVYLYLNKHHVDDQETEDYDCNKMSEINLNKAAQLRRYCGLS
11. Ken06 Bus KM111295 MGF360-13L	SVGTSCI - YAKYIRIYIKICVYLYLNKHHADQETDDYDCNKMSEINLNKAAQLRRYCGLS
12. Ken05T1 KM111294 MGF360-13L	SVGTSCI - YAKYIRIYIKICVYLYLNKHHADQETDDYDCNKMSEINLNKAAQLRRYCGLS
13. Kenya 1950 AY261360 MGF360-13L	SVGTSCI - YAKYIRIYIKICVYLYLNKHHADQETDDYDCNKMSEIKLNKAAQLRRYCGLS
14. Benin 97/1 AM712239 MGF360-8L	- VKQS - EYKKSCHYVILSLDYYVNTTEQTEKDGNNKE - AGMNEDMLALVQEMGEHKLFM
15. BATV1 U18466 MGF360-8L	- VKQS - EYKKSCHYVILSLDYYVNTTEQTEKDGNNKE - AGMNEDMLALVQEMGEHKLFM
16. NHV KM262845 MGF360-8L	- VKQS - EYKKSCHYVILSLDYYVNTTEQTEKDGNNKE - AGMNEDMLALVQEMGEHKLFM
17. L60 KM262844 MGF360-8L	- VKQS - EYKKSCHYVILSLDYYVNTTEQTEKDGNNKE - AGMNEDMLALVQEMGEHKLFM
18. OURT 88/3 AM712240 MGF360-8L	- VKQS - EYKKSCHYVILSLDYYVNTTEQTEKDGNNKE - AGMNEDMLALVQEMGEHKLFM
19. E75 FN657520 MGF360-8L	- VKQS - EYKKSCHYVILSLDYYVNTTEQTEKDGNNKE - AGMNEDMLALVQEMGEHKLFM
20. Mkuzi 1979 AY261362 MGF-8L	- VKQS - EYKKSCHYVILSLDYYVNTTEQTEKDSNNKE - TGMNEDMLALVQEMGEHKLFM
21. Pteroniscus96/4 AY261363 MGF360-8L	- VKQS - EYKKSCHYVILSLDYYVNTTEQTEKDSNNKE - TGMNEDMLALVQEMGEHKLFM
22. Warthog AY261366 MGF360-8L	- VKQS - EYKKSCHYVILSLDYYVNTTEQTEKDSNNKE - TGMNEDMLTLVQEMGEHKLFM
23. Georgia 2007/1 FR602468 360-8L	- VKQS - EYKKSCHYVILSLDYYVNTTEQTEKDSNNKE - TGMNEDMLALVQEMGEHKLFM
24. Tengan 62 AY261364 MGF360-8L	- VKQS - EYKKSCHYVILSLDYYVNTTEQTEKERNNKE - IGMNEDMLALVQEMGEHKLFM
25. Warmbaths AY261365 MGF360-8L	- VKQS - EYKKSCHYVILSLDYYVNTTEQTEKDSNNKE - IGMNEDMLTLVQEMGEHKLFM
26. Malawi LJ-201 (1983) AY261361 MGF360-8L	- VKQS - EYKKSCHYVILSLDYYVNTTEQTEEDGNNKE - IGLNENILTLIQDFGEHKKFFI
27. Ken05T1 KM111294 MGF360-8L	- VKQS - EYKKSCHYVILSLDYYVNTTEQTEEDGNNKE - IGLNENILTLIQDFGEHKKFFI
28. Kenya 1950 AY261360 MGF360-8L	- LKQS - EYKHCDDYVIVN - DVHLNSEYTEKDGDKKO - ISLNNMLLMQDFGEHKKHLL
29. Ken06 Bus KM111295 MGF360-8L	- LKQS - EYKHCDDYVIVN - DVHLNSEYTEKDGDKKO - IGLNENMLILMQELAGHKKHLL

B1.

1. L60 KM262844 MGF360-13L	RTRMSEMMLNKVIQLRGYWGLNDLLWKVCNCTNLYEMKKVHDICCAKNLQGLSVYNNVF
2. Benin 97/1 AM712239 MGF360-13L	RTRMSEMMLNKVIQLRGYWGLNDLLWKVCNCTNLYEMKKVHDICCAKNLQGLSVYNNVF
3. E75 FN657520 MGF360-13L	RTRMSEMMLNKVIQLRGYWGLNDLLWKVCNCTNLYEMKKVHDICCAKNLQGLSVYNNVF
4. Mkuzi 1979 AY261362 MGF360-13L	RTRMSEMMLNKVIQLRGYWGLNDLLWKVCNCTNLYEMKKVHDICCAKNLQGLSVYNNVF
5. Georgia 2007/1 FR602468 360-13L	RTRMSEMMLNKVIQLRGYWGLNDLLWKVCNCTNLYEMKHIDICSTKNPGLSVYNNVF
6. Warthog AY261366 MGF360-13L	RTRMSEMMLNKVIQLRGYWGLNDLLWKVCNCTNLYEMKHIDICSTKNPGLSVYNNVF
7. Warmbaths AY261365 MGF360-13L	RTRMSEMMLNKVIQLRGYWGLNDLLWKVCNCTNLYEMKHIDICSTKNPGLSVYNNVF
8. Pteroniscus96/4 AY261363 MGF360-13L	RTRMSEMMLNKVIQLRGYWGLNDLLWKVCNCTNLYEMKHIDICSTKNPGLSVYNNVF
9. Tengan 62 AY261364 MGF360-13L	RTRMSEMMLNKVIQLRGYWGLNDLLWKVCNCTNLYEMKHIDICSTKNPGLSVYNNVF
10. Malawi LJ-201 (1983) AY261361 MGF360-13L	CNKMSEINLNKAAQLRRYCGLSSELLWKVDYDCTNYYDIEKINELSCIRNPGQLSVYNNVF
11. Ken06 Bus KM111295 MGF360-13L	CNKMSEINLNKAAQLRRYCGLSSELLWKVDYDCTNYYDIEKINELSCIRNPGQLSVYNNVF
12. Ken05T1 KM111294 MGF360-13L	CNKMSEINLNKAAQLRRYCGLSSELLWKVDYDCTNYYDIEKINELSCIRNPGQLSVYNNVF
13. Kenya 1950 AY261360 MGF360-13L	CNKMSEIKLNKAAQLRRYCGLSSELLWKVDYDCTNYYDIEKINELSCIRNPGQLSVYNNVF
14. Benin 97/1 AM712239 MGF360-8L	- AGMNEDMLALVQEMGEHKLFMNIFWIKLRFSGAYEIKIVDKMQCMQYFAQTTRYHTY
15. BATV1 U18466 MGF360-8L	- AGMNEDMLALVQEMGEHKLFMNIFWIKLRFSGAYEIKIVDKMQCMQYFAQTTRYHTY
16. NHV KM262845 MGF360-8L	- AGMNEDMLALVQEMGEHKLFMNIFWIKLRFSGAYEIKIVDKMQCMQYFAQTTRYHTY
17. L60 KM262844 MGF360-8L	- AGMNEDMLALVQEMGEHKLFMNIFWIKLRFSGAYEIKIVDKMQCMQYFAQTTRYHTY
18. OURT 88/3 AM712240 MGF360-8L	- AGMNEDMLALVQEMGEHKLFMNIFWIKLRFSGAYEIKIVDKMQCMQYFAQTTRYHTY
19. E75 FN657520 MGF360-8L	- AGMNEDMLALVQEMGEHKLFMNIFWIKLRFSGAYEIKIVDKMQCMQYFAQTTRYHTY
20. Mkuzi 1979 AY261362 MGF-8L	- TGMNEDMLALVQEMGEHKLFMNVFVCIKLRSGSAYEIKIVDKMQCMQYFAQTTRYHTY
21. Pteroniscus96/4 AY261363 MGF360-8L	- TGMNEDMLALVQEMGEHKLFMNVFVCIKLRSGSAYEIKIVDKMQCMQYFAQTTRYHTY
22. Warthog AY261366 MGF360-8L	- TGMNEDMLTLVQEMGEHKLFMNVFVCIKLRSGSAYEIKIVDKMQCMQYFAQTTRYHTY
23. Georgia 2007/1 FR602468 360-8L	- TGMNEDMLALVQEMGEHKLFMNVFVCIKLRSGSAYEIKIVDKMQCMQYFAQTTRYHTY
24. Tengan 62 AY261364 MGF360-8L	- IGMNEDMLALVQEMGEHKLFMNVFVCIKLRSGSAYEIKIVDKMQCMQYFAQTTRYHTY
25. Warmbaths AY261365 MGF360-8L	- IGMNEDMLTLVQEMGEHKLFMNVFVCIKLRSGSAYEIKIVDKMQCMQYFAQTTRYHTY
26. Malawi LJ-201 (1983) AY261361 MGF360-8L	- IGLNENILTLIQDFGEHKKFFINLVWIKLRSGNAYEIKIADQMCMQYFGQNSHQHTC
27. Ken05T1 KM111294 MGF360-8L	- IGLNENMLTLIQDFGEHKKHLLINTLWIKLRSGNAYEIKIADQMCMQYFGQNSHQHTC
28. Kenya 1950 AY261360 MGF360-8L	- ISLNNMLLMQDFGEHKKHLLINTLWIKLRSGNASEIKIVDKMHCMQDFGQNSHQHTC
29. Ken06 Bus KM111295 MGF360-8L	- IGLNENMLILMQELAGHKKHLLINTLWIKLRSGNASEIKIVDKMHCMQDFGQNSHQHTC

B2.

Рис 1. A1 – N-конец протеинов MGF110 12L, 13L и 14L, **A2** – C-конец протеинов MGF110 12L, 13L и 14L. На рисунке виден индекс протяженностью в 55 аминокислот и характерный для последовательностей MGF110 12L Georgia 2007/1, Warmbaths, Warthog, L60, E75, Benin 97/1 и Mkuzi 1979. **B-1** – N-конец протеинов MGF360 13L и 8L, **B-2** – C-конец протеинов MGF360 13L и 8L. Выравнивание аминокислотных последовательностей генов MGF360 13L и 8L. Из обоих выравниваний удалены инвариантные позиции.

Полученный нами переукоренённый байесовский вывод для последовательностей протеина A859L кластеризует последовательности ВАЧС по двум сестринским субкладам, имеющим максимально возможную постериорную вероятность поддержки узлов, каждая из которых в свою очередь делится на две сестринские субклады (рис. 2B.). Эти данные лишь частично согласуются с данными de Villiers и соавторов, и в большей степени согласуются с полученными нами данными по гену MGF110 12L (см. выше).

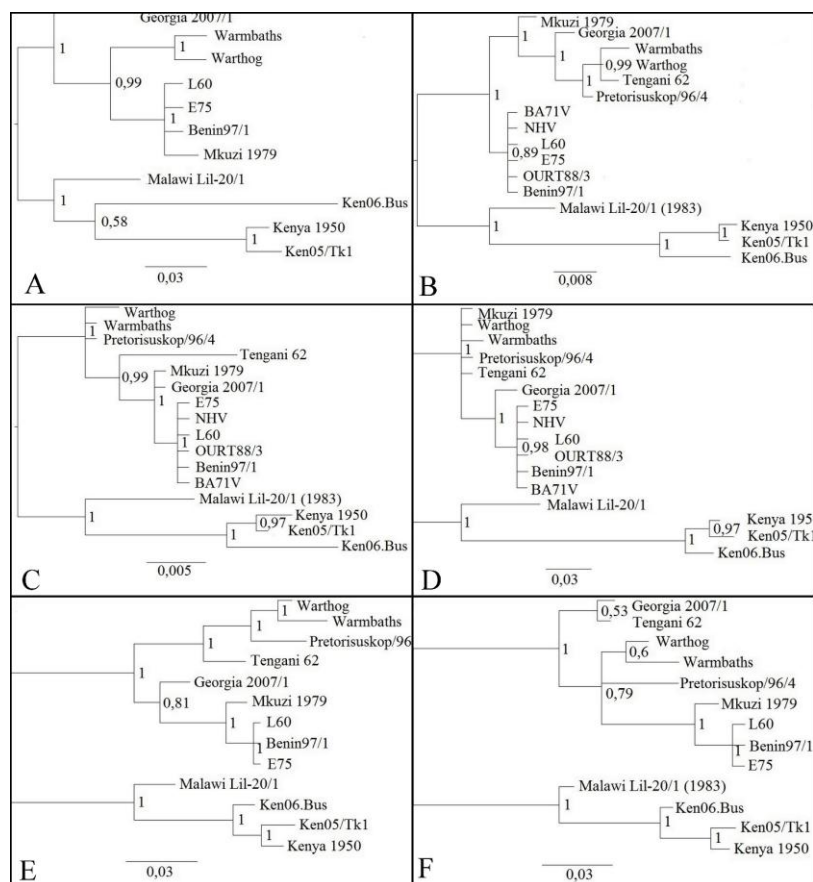


Рис 2. А. Байесовский вывод, построенный на основании множественного выравнивания протеинов MGF110 12L и переукоренённый на основании синапоморфной делеции MGF110 12L. В. Байесовский вывод, построенный на основании множественного выравнивания протеинов A859L. С. Байесовский вывод, построенный на основании множественного выравнивания протеинов D1133L. D. Байесовский вывод, построенный на основании множественного выравнивания протеинов D129L. Е. Байесовский вывод, построенный на основании множественного выравнивания протеинов MGF360 13L. F. Байесовский вывод, построенный на основании множественного выравнивания C конца протеинов MGF360 13L.

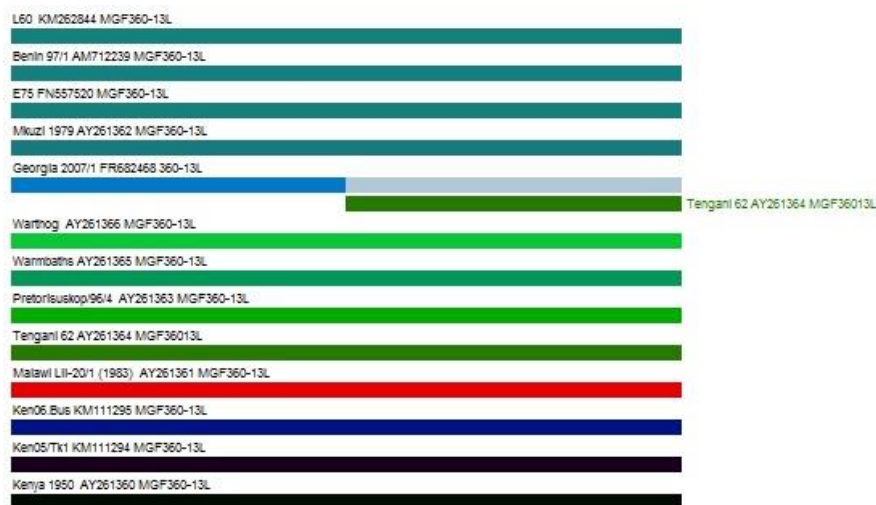
D1133L. Ген D1133L кодирует геликазу и располагается в правой вариабельной части генома. Переукоренённый байесовский вывод для гена D1133L показывает существование субклада в составы которых, с одной стороны, входят последовательности Malawi Lil-20/1 (1983), Kenya 1950, Ken05/Tk1 и Ken06.Bus, а с другой – последовательности Warthog, Warmbaths, Tengani 62, Pretorisuskop/96/4, Georgia 2007/1, Mkuzi 1979 и последовательности генотипа I (рис. 2С.). При этом последовательности Georgia 2007/1 и Mkuzi 1979 располагаются базально по отношению к последовательностям генотипа I.

D129L. Функция протеинов D129L неизвестна. Ген D129L располагается в правой вариабельной части геномов ВАЧС. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей D129L не выявляет парсимонийно информативных позиций, характеризующих последовательности Warthog, Warmbaths, Tengani 62 и Pretorisuskop/96/4. По этой причине переукоренённый байесовский вывод для после-

довательностей D129L не группирует эти последовательности в отдельную субкладу (рис. 2D.). Тем не менее, как и в предыдущих случаях, последовательности делятся на две сестринские ветви, в которых составы последовательностей генотипов совпадают.

MGF360 13L. Общее количество паралогов и ортологов MGF360 среди изолятов ВАЧС доходит до 22. Однако в индивидуальных геномах их количество меньше, от 11 у низковирулентного изолята OURT88/3 и тканеадаптированного изолята BA71V до 18 у Mkuzi 1979 [9]. Гены MGF360 13L располагаются в левой варибельной части геномов вируса ВАЧС. Построение филогенетического дерева нуклеотидных последовательностей MGF360 методом максимального правдоподобия (ML) показывает кластеризацию последовательностей MGF360 13L и 8L в одной субкладе со значением бутстреп поддержки узла равным 100 (данные не приведены). В то же время выравнивание аминокислотных последовательностей генов MGF360 13L и 8L с аминокислотными последовательностями генов MGF360 4L и 6L, располагающихся базально по отношению к субкладе, включающей в себя субкладу MGF360 13L и 8L, позволяет выявлять плезиоморфные и синапоморфные состояния аминокислот и аминокислотных позиций внутри последовательностей MGF360 13L и 8L. Байесовский вывод для гена MGF360 13L показывает существование двух основных ветвей эволюции ВАЧС, каждая из которых делится на две, что соответствует приведённым выше данным (рис. 2 E.). За исключением постериорной вероятности узла субклады, включающей в себя последовательность Georgia 2007/1, все остальные узлы имеют максимальную поддержку. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей генов MGF360 13L и 8L позволяет выявить как синапоморфии субклад, так и парсимонийно информативные позиции (рис. 1B). Выявление синапоморфий позволяет кластеризовать последовательности MGF360 13L по трём субкладам: 1. Malawi Lil-20/1, Ken06.Bus, Ken05/Tk1 и Kenya 1950, 2. Mkuzi 1979, L60, Benin 97/1 и E75, 3. Tengani 62, Pretoriuskop/96/4 Warmbaths и Warthog. Вопрос систематического положения Georgia 2007/1 не однозначен. Анализ синапоморфий аминокислотных последовательностей гена MGF360 13L показывает, что на N конце белка последовательность Georgia 2007/1 кластеризуется вместе с последовательностями Mkuzi 1979, L60, Benin 97/1 и E75, тогда как на C конце вместе с последовательностями Tengani 62, Pretoriuskop/96/4 Warmbaths и Warthog (рис. 1B). Более того, из рисунка 1B видно, что последовательность Georgia 2007/1 на C конце аминокислотной последовательности имеет 2 синапоморфии с последовательностью Tengani 62, что позволяет предположить либо нерцепируемую передачу генетической информации от Tengani 62 (или близкородственной последовательности) к Georgia 2007/1 (или предковому по отношению к Georgia 2007/1 изоляту), либо рекомбинационное событие между указанными вариантами. Байесовский вывод для C конца протеинов MGF360 13L подтверждает это предположение, хотя и с низким значением постериорной вероятности узла субклады, включающей последовательности Georgia 2007/1 и Tengani 62 (рис. 2F). С целью подтверждения рекомбинационного/конверсионного события между последовательностями Georgia 2007/1 и Tengani 62 нами были использованы различные программы, входящие в пакет программ RDP4 v4.66, предназначенные для выявления конверсионных и рекомбинационных событий. При помощи программ RDP, GENECONV, BootScan, MaxiChi, Chimaera, SiScan и PhyPro нами было обнаружено одно событие по передаче генетической информации от последовательности Tengani 62 или близкородственной последовательности по направлению к последовательности Georgia 2007/1 или к предковой для Georgia 2007/1 последовательности, начинающееся с 528 нуклеотида и продолжающееся по 1062 (рис. 3).

А



В.

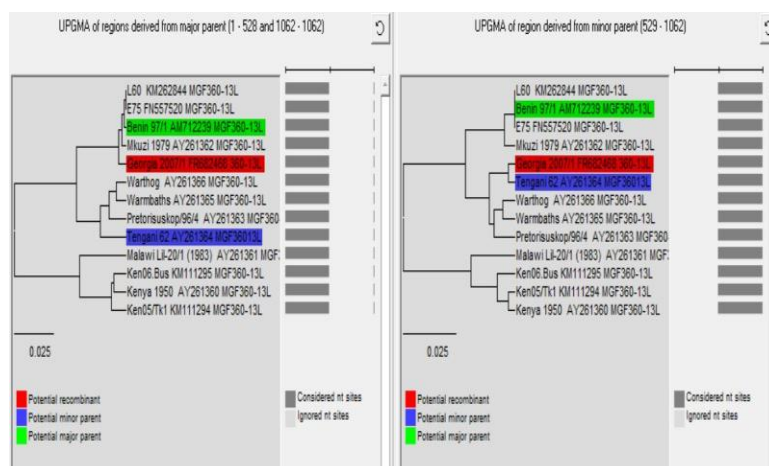


Рис 3. А. Локализация рекомбинационного/нереципрокного события среди нуклеотидных последовательностей MGF360 13L. Минорной предковой последовательностью была определена последовательность Tengani 62. **В.** UPGMA деревья с1 по 528 нуклеотид и с 529 по 1062 нуклеотид.

Построение филогенетической гипотезы методом UPGMA при помощи пакета программ RDP v.4.66 подтвердило полученные данные (рис. 3. В.).

Присутствие в 16 полностью секвенированных геномах подавляющего большинства генов мультигенных семейств указывает на их паралогичное происхождение. В то же время наличие в отдельных изолятах индивидуальных генов MGF указывает на их ортологичное происхождение. Наличие паралогов MGF подразумевает дубликации начального небольшого количества генов, которые в конечном итоге можно свести к одному, общему для данного MGF, анцестарльному гену. Применение алгоритмов максимального правдоподобия и максимальной парсимонии по отношению к паралогам MGF позволяет выстраивать филогенетические гипотезы.

При этом переукоренение не нарушает филогенетических взаимоотношений внутри близкородственных генов MGF, имеющих прямого общего предка. Таким образом, такие группы могут быть охарактеризованы как монофилетические, что в свою очередь позволяет нередко выявлять анцестральное состояние признака по данной нуклеотидной или аминокислотной позиции. Такой подход позволил нам выявить и охарактеризовать как синапоморфные делеции два инделя внутри генов MGF110 12L, 13L и 14L. Первая из делеций является синапоморфной для последовательностей MGF110 12L Georgia 2007/1 (генотип II), Warmbaths (генотип III/I), Warthog (генотип IV), Mkuzi 1979 (генотип I/VII), L60 (генотип I), E75 (генотип I) и Benin 97/1 (генотип I), располагая их сестрински по отношению к субкладе, состоящей из последовательностей Malawi Lil-20/1 (1983) (генотип VIII), Ken06.Bus (генотип IX), Kenya 1950 (генотип X) и Ken05/Tk1 (генотип X). В свою очередь последовательности Mkuzi 1979, L60, E75 и Benin 97/1 имеют синапоморфную делецию в генах MGF110 12L, 13L и 14L, что доказывает их монофилетическое происхождение. Эта группа последовательностей образует сестринскую субкладу по отношению к последовательностям Georgia 2007/1, Warmbaths, Warthog.

Схожая картина обнаруживается и среди генов MGF360 13L. Байесовский анализ распределяет последовательности MGF360 13L по трём субкладам, при этом, в отличие от генов MGF110 12L, располагая последовательность Georgia 2007/1 базально по отношению к последовательностям Mkuzi 1979 и генотипа I. Однако сравнительный анализ не позволяет выявить синапоморфии Georgia 2007/1 и последовательностей Mkuzi 1979, а также генотипа I. Парсимонийно информативные позиции, объединяющие эти последовательности, могут быть как синапоморфиями, так и плезиоморфными состояниями нуклеотидных позиций. Интересно, что С-конец аминокислотной последовательности Georgia 2007/1 имеет не только парсимонийно информативные позиции, характеризующие последовательности Warthog, Warmbaths, Pretorisuskop/96/4 и Tengani 62, но также синапоморфии с последовательностью Tengani 62, что указывает на происхождение 3' части гена MGF360 13L Georgia 2007/1 от Tengani 62 или близкородственной последовательности, что было подтверждено при помощи пакета программ RDP v.4.66.

Байесовские выводы для генов D1133L, A859L и D129L, переукоренённые на основании синапоморфной делеции MGF110 12L, также указывают на существование двух основных ветвей эволюции, состоящих, с одной стороны, из последовательностей генотипов VIII, XI и X, а с другой – из последовательностей I, II, I/VII, IV, XX/I и V/I генотипов. При этом последовательности Pretorisuskop/96/4, Tengani 62, Warthog и Warmbaths в случаях с генами MGF110 12L, A859L и MGF360 13L образуют субклады, что указывает на их монофилетическое происхождение. Однако по генам D1133L и D129L эти последовательности не образуют субклад и располагаются базально по отношению к последовательностям генотипа I. Это может быть объяснено высоким уровнем константности этих генов и, как следствие, отсутствием синапоморфий этих последовательностей.

По генам MGF110 12L и MGF360 13L последовательности Mkuzi 1979 располагаются базально по отношению к последовательностям генотипа I. Такая картина имеет место по подавляющему большинству генов и аминокислот 16 totally секвенированных геномов ВАЧС (данные не опубликованы). В то же время по некоторым генам и аминокислотным последовательностям последовательности Mkuzi 1979 выпадают из субклады, включающей последовательности генотипа I (ген A859L, рис. 2А), что может быть объяснено двумя взаимно не исключаящими причинами (см. ниже). Схожая ситуация наблюдается и с последовательностями Georgia 2007/1. По гену MGF110 12L последовательность Georgia 2007/1 располагается базально по отношению ко всей субкладе (рис. 2А). Однако по генам

MGF360 13L, D1133L и D129L последовательности Georgia 2007/1 располагаются базально по отношению к последовательностям генотипа I, а по гену A859L по отношению к последовательностям Pretorisuskop/96/4, Tengani 62, Warthog и Warmbaths (рис. 2).

С одной стороны, последовательности Mkuzi 1979 и Georgia 2007/1 по некоторым генам могли сохранить в себе больше анцестральных признаков и не иметь части синапоморфий субклады, включающей последовательности генотипа I. Другим объяснением этого феномена может быть реципрокная/нереципрокная передача генетической информации между разными генотипами. Наши неопубликованные данные по байесовским выводам, полученные по отношению практически ко всем генам 16 totally секвенированных генов, показывают, что в центральной невариабельной части последовательности генов изолята Georgia 2007/1 кластеризуются в основном базально по отношению к последовательностям Mkuzi 1979 и генотипов I, а по вариобельным фланкам они нередко попадают в одну субкладу с последовательностями Pretorisuskop/96/4, Tengani 62, Warthog и Warmbaths. В некоторых случаях последовательности Georgia 2007/1 попадали в субкладу с последовательностями генотипов VII, IX и X. Эти факты также указывают на рекомбинационное/конверсионное происхождение части генов изолята Georgia 2007/1. В пользу этой гипотезы говорит географическая неразобъённости генотипов, среди которых обнаруживаются предположительные события по обмену генетическим материалом между различными генотипами [6].

ЛИТЕРАТУРА

1. Aguero M., Blasco R., Wilkinson P., Vinuela E. Analysis of naturally occurring deletion variants of African swine fever virus. multigene family – 110 is not essential for infectivity or virulence in pigs. *Virology*, 176, 1, pp. 195-204, 1990.
2. Bastos A.D., Penrith M.-L., Cruciere C., Edrich J.L., Hutchings G., Roger F., Couacy-Hymann E., Thomson G.R. Genotyping field strains of African swine fever virus by partial p72 gene characterisation. *Arch. Virol.*, 148, pp 693-706, 2003.
3. Boshoff C.I., Bastos A.D.S., Gerber L.J., Vosloo W. Genetic characterization of African swine fever viruses from outbreaks in southern Africa (1973-1999). *Vet. Microbiol.*, 121, pp. 45-55, 2007.
4. Chapman D.A.G., Tcherepanov V., Upton C., Dixon L.K. Comparison of the genome sequences of nonpathogenic and pathogenic African swine fever virus isolates. *Journal of General Virology*, 89, pp. 397-408, 2008.
5. Chapman D.A.G., Alistair C.D., Da Silva M., Upton C., Radford A.D., Dixon L.K. Genomic Analysis of Highly Virulent Georgia 2007/1 Isolate of African Swine Fever Virus. *Emerg. Infect. Dis.*, 17, 4, pp. 599-605, 2011.
6. Costard C., Wieland B., de Glanville W., Jori F., Rowlands R., Vosloo W., Roger F., Pfeiffer D.U., Dixon L.K. African swine fever: how can global spread be prevented? *Phil. Trans. R. Soc. B*, 364, pp. 2683-2696, 2009.
7. Denyer M.S., Wilkinson P.J. African Swine Fever. *Encyclopedia of Immunology*, pp. 54-56, 1998.
8. de Villiers E.P., Gallardo C., Arias M., da Silva M., Upton C., Martin R., Bishop R.P. Phylogenomic analysis of 11 complete African swine fever virus genome sequences. *Virology*, 400, pp. 128-136, 2010.
9. Dixon L.K., Chapman D.A.G., Netherton C.L., Upton C. African swine fever virus replication and genomics. *Virus Research*, 173, 1, pp. 3-14, 2013.
10. Gallardo C., Anchuelo R., Pelayo V., Poudevigne F., Leon T., Nzoussi J., Bishop R., Pérez P., Soler A., Nieto R., Martín H., Arias M. African Swine Fever Virus p72 Genotype IX in Domestic Pigs, Congo, 2009. *Emerging Infectious Diseases*, 17, 8, pp. 1556-1558, 2011.

11. Gallardo C., Fernández-Pinero J., Pelayo V., Gazaev I., Markowska-Daniel I., Pridotkas G., Nieto R., Fernández-Pacheco P., Bokhan S., Nevolko O., Drozhzhe Z., Pérez C., Soler A., Kolbasov D., Arias M. Genetic Variation among African Swine Fever Genotype II Viruses, Eastern and Central Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 20, 9, pp. 1544-1547, 2014.
12. Goller K.V., Malogolovkin A.S., Katorkin S., Kolbasov D., Titov I., Hoper D., Beer M., Gunther M.K., Portugal R., Blome S. Tandem Repeat Insertion in African Swine Fever Virus. *LETTERS*, 21, 4, pp 731-732, 2015.
13. Heath L., van der Walt E., Varsani A., Martin D.P. Recombination Patterns in Aphthoviruses Mirror Those Found in Other Picornaviruses. *Journal of Virology*, 80, 23, pp. 11827-11832, 2006.
14. Henning W. Cladistic analysis or cladistic classification': a reply to Ernst Mayr. *Systematic Zoology*, 24, 2, pp. 244-256, 1975.
15. Krug P.W., Holinka L.G., O'Donnell V., Reese B., Sanford B., Fernandez-Sainz I., Gladue D.P., Arzt J., Rodriguez L., Risatti G.R., Borcaa M.V. The Progressive Adaptation of a Georgian Isolate of African Swine Fever Virus to Vero Cells Leads to a Gradual Attenuation of Virulence in Swine Corresponding to Major Modifications of the Viral Genome. *Journal of Virology*, 89, 4, pp. 2324-2332, 2015.
16. Michaud V., Randriamparany T., Albina E. Comprehensive Phylogenetic Reconstructions of African Swine Fever Virus: Proposal for a New Classification and Molecular Dating of the Virus. *PLOS ONE*, 8, 7, pp. 1-14, 2013.
17. Pires S., Ribeiro G., Costa J.V. Sequence and organization of the left multigene family 110 region of the Vero-adapted L60V strain of African swine fever virus. *Virus Genes*, 15, 3, pp. 271-274, 1997.
18. Rodriguez J.M., Moreno L.T., Alejo A., Lacasta A., Rodriguez F., Salas M.L. Genome Sequence of African Swine Fever Virus BA71, the Virulent Parental Strain of the Nonpathogenic and Tissue-Culture Adapted BA71V. *PLOS ONE*, 10, 11, pp. 1-22, 2015.
19. Stasiak K., Renault S., Demattei M-V., Bigot Y., Federici B.A. Evidence for the evolution of ascoviruses from iridoviruses. *Journal of General Virology*, 84, pp. 2999-3009, 2003.
20. Vinuela E. African swine fever virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*, 116, pp. 151-170, 1985.

Поступила 20.01.2016



Биол. журн. Армении, 2 (68), 2016

РОЛЬ ХОЛИНОВЫХ ЭФИРОВ N-ЗАМЕЩЁННЫХ- α , β -ДЕГИДРО-АМИНОКИСЛОТ В КОРРЕКЦИИ СИНДРОМА НИЗКОГО ТРИЙОДТИРОНИНА ПРИ ГЕМИСЕКЦИИ СПИННОГО МОЗГА

В.О. ТОПУЗЯН, Т.С. ХАЧАТРЯН

Научно-технологический центр органической и фармацевтической химии НАН РА
tskhachatryan@outlook.com

Исследовались концентрации тиреотропного гормона гипофиза и тиреоидных гормонов в сыворотке крови у крыс при гемисекции спинного мозга с наличием синдрома низкого трийодтиронина, до и после изолированного воздействия сверхмалых доз 10^{-9} М холиновых эфиров N-замещённых- α , β -дегидроаминокислот. Показано, что в условиях гемисекции спинного мозга у крыс наблюдалось снижение концентрации свободных тиреоидных гормонов в сыворотке крови, вызванное патологией щитовидной железы. После изолированного воздействия сверхмалой дозы 10^{-9} М холиновых эфиров N-замещённых- α , β -дегидроаминокислот в сыворотке крови у крыс в условиях гемисекции спинного мозга наблюдалось повышение уровня свободных тиреоидных гормонов, с достижением такового у интактных животных.

*Тиреотропный гормон гипофиза – тироксин – трийодтиронин –
холиновые эфиры – гемисекция спинного мозга*

Տվյալ հետազոտության նպատակն է հիպոֆիզի թիրեոտրոպ հորմոնի և վահանագեղձի հորմոնների կոնցենտրացիայի փոփոխության հետազոտությունը առնետների արյան շիճուկում, ողնուղեղի կիսահատման պայմաններում՝ ցածր տրիյոդթիրոնինի սիմպտոմի առկա-յության դեպքում, N-տեղակալված- α , β -դեհիդրոամինաթթուների խլիկի եթերների 10^{-9} Մ գերցածր չափաբաժնի ազդեցությունից առաջ և հետո: Հետազոտությունները ցույց են տվել, որ ողնուղեղի կիսահատման պայմաններում առնետների մոտ դիտվում է ազատ թիրեոիդային հորմոնների կոնցենտրացիայի իջեցում, որը պայմանավորված էր վահանագեղձի ախտաբանությամբ: N-տեղակալված- α , β -դեհիդրոամինաթթուների խլիկի եթերների 10^{-9} Մ գերցածր չափաբաժնի մեկուսացված ազդեցությունից հետո ողնուղեղի կիսահատման պայմաններում, առնետների արյան շիճուկում դիտվում է թիրեոիդային հորմոնների մակարդակի բարձրացում, հասնելով նրան ինտակտ կենդանիների մոտ արձանագրվող մակարդակին:

*Հիպոֆիզի թիրեոտրոպ հորմոն – թիրոքսին – տրիյոդթիրոնին –
խլիկի եթերներ – ողնուղեղի կիսահատում*

The purpose of the present research is investigation of concentration of thyroid-stimulating hormone and thyroid hormones in blood serum of rats at hemisection of spinal cord in presence of low triiodothyronine syndrome, before and after isolated influence of ultra-low dose 10^{-9} M of choline ethers of N-substituted- α , β -dehydroaminoacids. Results of investigations have shown that in the conditions of spinal cord hemisection of in rats the concentration of free thyroid hormones in blood serum was decreased caused by a thyroid gland pathology. After the isolated influence of ultra-low dose of 10^{-9} M choline ethers of N-substituted- α , β -dehydroaminoacids in blood serum of rats with hemisection of spinal cord the level of free thyroid hormones was increased to the level observed at intact animals.

*Thyroid-stimulating hormone – thyroxin – triiodothyronine – choline ethers –
spinal cord hemisection*

Известно, что нейродегенеративные заболевания спинного мозга (СМ), в том числе и рассматриваемая в настоящем исследовании гемисекция (ГМС), относятся к важнейшим нерешённым проблемам современной медицины [2]. Системные проявления повреждений СМ связаны с прогрессирующим вовлечением в патологический процесс гормональной системы [15]. Исследование тиреоидной функции в течение первой недели со дня спинального повреждения позволило выявить изменение уровней тироксина (Т4) и трийодтиронина (Т3), которые укладываются в картину синдрома низкого трийодтиронина (СНТ). При этом не только значительно снижается концентрация общего и свободного Т3, но и уменьшается конверсия Т4 в Т3. СНТ является часто встречаемым и распространённым патологическим состоянием в современной эндокринологии, однако в его диагностике и терапии остаётся много вопросов, не имеющих однозначной трактовки. Поэтому у учёных разных стран не ослабевает интерес к изучению различных аспектов СНТ, обусловленного стойким дефицитом тиреоидных гормонов (ТГ) в организме [20]. ГМС характеризуется тем, что в месте повреждения СМ происходит образование глиальной мембраны и формирование соединительнотканного рубца, который служит основным препятствием для прохождения нервных импульсов. В нашем предыдущем исследовании [4] по воздействию гормональных и ферментных препаратов (протеолитических и муколитических) при спинальных патологиях разной степени интенсивности показана положительная роль терапевтических, малых и сверхмалых (СМД препаратов) трипсина, химотрипсина, лидазы, эласатазы, гиалуронидазы и других.

Одним из современных направлений фармацевтической химии является разработка методов синтеза и изучение свойств биологически активных веществ (БАВ) на основе ненасыщенных или α,β -дегидроаминокислот. Холиновые эфиры N-замещённых- α,β -дегидроаминокислот (ХЭА) имеют сравнительно небольшую историю. По структуре они напоминают ацетилхолин, в связи с чем вызывают в последние годы большой интерес с точки зрения их синтеза и биологической активности. В процессах синтеза ХЭА применяются основные положения, существующие в фармацевтической химии, согласно которым проводится выбор соответствующих защитных групп, способов синтеза эфира, удаление защиты и выделения конечного продукта [5, 6]. Согласно [1], эфирами и амидами холина натурального и синтетического происхождения осуществляется ряд важнейших функций в организме млекопитающих. В представленных исследованиях, исходя из химических и биологических особенностей ХЭА, проведено изучение изолированного воздействия СМД 10^{-9} М ХЭА у крыс в условиях левосторонней латеральной ГМС СМ на уровне Т9 с наличием СНТ. Внутримышечные инъекции ХЭА проводили в СМД 10^{-9} М в течение 14 послеоперационных дней во всех группах животных.

Материал и методика. В настоящем исследовании в Научно-технологическом центре органической и фармацевтической химии Национальной Академии наук Республики Армении осуществлён синтез 9 ХЭА. Более подробно с методом синтеза ХЭА можно ознакомиться в работе [14]. Были получены следующие химические соединения:

1. холиновый эфир N-(4-бромбензоил)-3,4-диоксиметилен- α,β -дегидрофенилаланина (ХЭД1);
2. холиновый эфир N-бензоил-O-метил- α,β -дегидротирозина (ХЭД2);
3. холиновый эфир N-(4-бромбензоил)-O-изопропил- α,β -дегидротирозина (ХЭД3);
4. холиновый эфир N-(4-бромбензоил)-4-хлор- α,β -дегидрофенилаланина (ХЭД4);
5. холиновый эфир N-(4-бромбензоил)-O-метил- α,β -дегидротирозина (ХЭД5);
6. холиновый эфир N-бензоил- α,β -дегидрофенилаланина (ХЭД6);
7. холиновый эфир N-(4-изобутоксibenзоил)-O-изопропил- α,β -дегидротирозина (ХЭД7);

8. холиновый эфир N-(2-метоксибензоил)-О-метил- α,β -дегидротирозина (ХЭД8);
9. холиновый эфир N-(2-метоксибензоил)-О-изопропил- α,β -дегидротирозина (ХЭД9).

Исследования проведены на 120 крысах-самцах линии Вистар, массой 180 – 220 г., разделённых на 4 подопытные группы:

1. интактные животные – 10 шт.;
2. контрольные животные с СНТ – 10 шт.;
3. контрольные животные с левосторонней латеральной ГМС СМ – 10 шт.;
4. животные с левосторонней латеральной ГМС СМ с СНТ, получавшие СМД 10-9 М ХЭА – 90 шт. (по 10 шт. на каждый эфир).

В проведенных сериях исследований использовалась хирургическая модель ГМС. Более подробно с методикой проведения ГМС можно ознакомиться в исследовании [8]. СНТ для группы контрольных животных был получен путём каждодневных внутримышечных инъекций дозы СМД 10^{-3} М препарата “Пропилтиоурацил”, полученной как и СМД 10^{-9} М, многостаканным методом Ганемана [3], подопытным крысам в течение 7 дней. В сыворотке крови с помощью метода иммуноферментного анализа (ИФА) определялась концентрация тиреотропного гормона гипофиза (ТТГ), свободных Т3 и Т4 посредством иммуноферментного анализатора “RISER 8793”. В проведенных сериях экспериментов принцип работы набора заключался в том, что определение уровня ТТГ (или ТГ) основано на использовании конкурентного варианта твердофазного ИФА [7]. Статистическая обработка результатов производилась с использованием параметрического однофакторного дисперсионного анализа (one-way Anova) и постдисперсионного анализа Холм-Сидака с помощью пакета программ “Sigma Plot 12. 0 for Windows” и “Microsoft Excel 2013”. В данных сериях исследований использовались графики гистограмм накопления. Гистограммы с накоплением данных используются для сравнения частей общего значения и применяются для отображения изменения сегмента общего значения с временем. Эксперименты проводились с соблюдением принципов “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и других научных целей” (Страсбург, 1986) и постановления первого национального конгресса по биоэтике (Киев, 2001).

Результаты и обсуждение. В проведенных сериях исследований у крыс в условиях латеральной ГМС СМ было выявлено наличие СНТ, выражающееся в резком снижении референсных диапазонов концентрации (РДК) свободных Т3 и Т4 (рис. 1, группы 5, 6) в сыворотке крови по сравнению с их нормальными значениями (рис. 1, группы 2, 3).

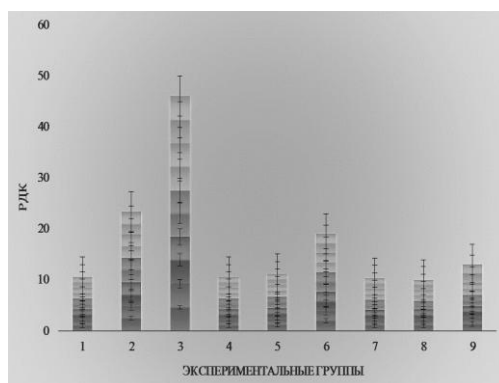


Рис. 1. РДК концентрации ТТГ (группа 1), свободного Т3 (группа 2) и свободного Т4 (группа 3) в сыворотке крови в норме, в условиях латеральной ГМС СМ (ТТГ (группа 4), свободный Т3 (группа 5), свободный Т4 (группа 6)) и у крыс с моделью СНТ без спинальных повреждений (ТТГ (группа 7), свободный Т3 (группа 8), свободный Т4 (группа 9)). Концентрация ТТГ выражена в мкМЕ/мл; свободного Т3 – в нг/мл; свободного Т4 – в мкг/мл. Число животных в каждой рассматриваемой группе ($n=10$). Постдисперсионный анализ Холм-Сидака при сравнении всех групп $F=91.49, p < 0.001$.

Достоверность наличия СНТ в наших исследованиях подтверждена регистрацией аналогичных сдвигов РДК свободных ТГ в сыворотке крови у крыс без спинальных повреждений на экспериментальной модели СНТ (рис. 1, группы 8, 9). Что же касается показателей РДК сывороточного ТТГ, то они в проведенных сериях исследований оставались неизменными, что присуще СНТ (рис. 1, группы 1, 4, 7).

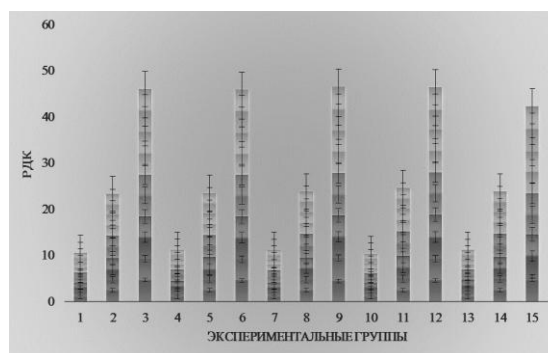


Рис. 2. Эффекты изолированного воздействия сверхмалой дозы 10^{-9} М ХЭД1 – ХЭД5 на изменение РДК концентрации ТТГ и свободных ТГ в сыворотке крови у крыс в условиях латеральной гемисекции спинного мозга с наличием синдрома низкого трийодтиронина. ТТГ – группы 1, 4, 7, 10, 13; свободный Т3 – группы 2, 5, 8, 11, 14; свободный Т4 – группы 3, 6, 9, 12, 15. Концентрация ТТГ выражена в мкМЕ/мл; свободного Т3 – в нг/мл; свободного Т4 – в мкг/мл. Число животных в каждой рассматриваемой группе ($n=10$). Постдисперсионный анализ Холм-Сидака при сравнении всех групп: $F=55.21$, $p < 0.001$.

Данная закономерность, установленная в наших исследованиях, полностью согласуется с результатами исследований ряда зарубежных авторов по аналогичной рассматриваемой проблеме [16, 17]. В следующей серии исследований, исходя из полученных в предыдущей серии результатов, нами изучалось изолированное воздействие СМД 10^{-9} М ХЭА в условиях ГМС СМ с наличием СНТ у крыс (рис. 2, 3). На рис. 2 приведены накопительные диаграммы изменения РДК свободного Т3 и свободного Т4 и их неизменность в отношении ТТГ в условиях острого спинального повреждения. Проведенные нами исследования иллюстрируют восстановительное воздействие ХЭД1 – ХЭД5 в отношении РДК свободных ТГ практически с достижением таковых у интактных животных (рис. 1, группы 2, 3). Как видно на рис. 2, систематические аппликации СМД 10^{-9} М ХЭД1 (рис. 2, группы 2, 3), ХЭД2 (рис. 2, группы 5, 6), ХЭД3 (рис. 2, группы 8, 9), ХЭД4 (рис. 2, группы 11, 12) и ХЭД5 (рис. 2, группы 14, 15) способствуют восстановлению до нормы нарушенных вследствие ГМС и СНТ показателей РДК свободных ТГ: Т3 и Т4.

Что же касается исследования РДК ТТГ в сыворотке крови у спинальных крыс (рис. 2, группы 1, 4, 7, 10, 13), то после воздействия СМД 10^{-9} М ХЭА, он оставался неизменным по сравнению с таковым у интактных животных (рис. 1, группа 1), у крыс с ГМС СМ (рис. 1, группа 4) и у крыс с моделью СНТ без наличия ГМС (рис. 1, группа 7).

На рис. 3 представлены результаты исследований по изучению закономерностей изменения РДК свободных ТГ в сыворотке крови у крыс с ГМС СМ с наличием СНТ после изолированного воздействия СМД 10^{-9} М ХЭД6 – ХЭД9. В этих исследованиях, аналогично предыдущим сериям, зарегистрировано протекторное действие ХЭА: ХЭД6 – ХЭД9 в отношении РДК свободных ТГ также с достоверным приближением к интактным значениям (рис. 1, группы 2, 3).

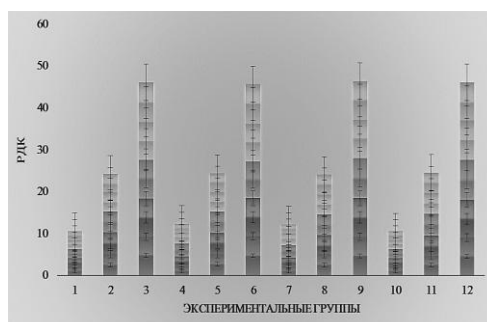


Рис. 3. Эффекты изолированного воздействия сверхмалой дозы 10^{-9} М ХЭД6 – ХЭД9 на изменение РДК концентрации ТТГ и свободных ТГ в сыворотке крови у крыс в условиях латеральной гемисекции спинного мозга с наличием синдрома низкого трийодтиронина. ТТГ – группы 1, 4, 7, 10; свободный Т3 – группы 2, 5, 8, 11; свободный Т4 – группы 3, 6, 9, 12. Концентрация ТТГ выражена в мкМЕ/мл; свободного Т3 – в нг/мл; свободного Т4 – в мкг/мл. Число животных в каждой рассматриваемой группе ($n=10$). Постдисперсионный анализ Холм-Сидака при сравнении всех групп $F=77.38$, $p < 0.001$.

Как видно на рис. 3, систематические аппликации СМД 10^{-9} М ХЭД6 (рис. 3, группы 2, 3), ХЭД7 (рис. 3, группы 5, 6), ХЭД8 (рис. 3, группы 8, 9) и ХЭД9 (рис. 3, группы 11, 12) способствуют повышению нарушенных вследствие ГМС и СНТ показателей РДК свободных ТГ: Т3 и Т4. Что же касается исследования РДК ТТГ в сыворотке крови у спинальных крыс (рис. 3, группы 1, 4, 7, 10), то после воздействия СМД 10^{-9} М ХЭА он также, как и в предыдущем рассматриваемом случае, оставался неизменным по сравнению с таковым у интактных, спинальных крыс и у животных с СНТ без спинномозговых травм (рис. 1, группы 1, 4, 7).

Анализируя результаты проведенных серий исследований, можно сделать вывод о том, что изолированное применение в течение 14 дней СМД 10^{-9} М ХЭА в условиях острого спинального повреждения с наличием патологического состояния типа СНТ демонстрирует громадный потенциал биологической активности используемых химических соединений, относящихся к эфирам холина, который может быть использован для эффективного воздействия на биохимические и физиологические процессы и их регуляцию. Принимая во внимание, что нами в настоящих исследованиях установлен факт протекторного воздействия СМД 10^{-9} М ХЭА в отношении процессов регулирования РДК свободных ТГ в сыворотке крови у спинальных крыс с наличием СНТ, логично предположить, что и высокая фармакологическая активность использованных химических соединений, относящихся к ХЭА, содержащих материальные концентрации БАВ, будет обусловлена биологическими свойствами этих веществ. Согласно [18], тяжёлая травма позвоночника, осложнённая повреждением СМ в виде его компрессии, разможения, частичном или полном разрыве, остаётся одной из актуальных медико-социальных проблем, так как ведёт к глубокой инвалидности пострадавших. Высокая частота позвоночно-спинальной травмы сочетается со сложностью патогенеза травматической болезни СМ. Расстройства в деятельности ряда органов и систем, непосредственно не пострадавших при травме, создают новые многообразные патологические ситуации. В денервированных тканях повышается чувствительность к БАВ (ацетилхолину, адреналину и т. д.), возрастает возбудимость рецептивных полей, снижается порог мембранного потенциала, уменьшается содержание АТФ, гликогена, креатинфосфата [19]. В паретичных мышцах нарушается липидный и углеводный

обмен, что влияет на их механические свойства – растяжимость и сократимость, способствует регидности. Складываются связи, носящие разрушительный характер. Возникает угнетение и функциональное выпадение ряда систем, непосредственно в травме не пострадавших. Под действием непрерывного потока афферентной импульсации активные нервные структуры впадают в состояние парабิโอ́за и становятся невосприимчивыми к специфическим импульсам. Параллельно формируется и другая динамическая линия – восстановительно-приспособительных функциональных изменений. В условиях глубокой патологии происходит оптимально возможная перестройка механизмов обеспечения адаптации к среде. Организм переходит на новый уровень гомеостаза. В этих условиях гиперреактивности и напряжения формируется травматическая болезнь СМ [12].

В настоящее время патогенез СНТ неизвестен, но существует мнение, что он может включать сниженную периферическую конверсию Т4 в Т3, сниженный клиренс реверсного Т3 и пониженную способность ТГ к соединению с тироксин-связывающим глобулином (ТСГ). Противовоспалительные цитокины (фактор некроза опухолей α , ИЛ-1) могут быть ответственны за некоторые изменения [13]. Существует диагностическая дилемма: имеет ли пациент гипотиреоз или СНТ? Наилучшим лабораторным тестом для разрешения дилеммы является уровень ТТГ, который в случае СНТ обычно находится в норме или умеренно повышен, но не так высоко, как это могло быть при гипотиреозе. В условиях спинальных повреждений, согласно [11], следует максимально точно производить диагностику СНТ с целью исключения гипотиреоза и установления стойкого наличия СНТ. Исходя из вышеотмеченного, подходящей может оказаться терапия СНТ при острых спинальных повреждениях посредством применения СМД БАВ. Такими, на наш взгляд, являются ХЭА.

Подводя итоги проведенных исследований по изучению изолированного воздействия СМД 10^{-9} М ХЭА на моделях ГМС СМ с наличием СНТ, можно сделать вывод о том, что в целом имеется положительный эффект воздействия всех 9 ХЭА в отношении изменения РДК сывороточных ТГ. Все препараты проявляют протекторный эффект в данном рассматриваемом случае, благодаря, вероятно, их химической структуре и молекулярным особенностям воздействия СМД эфиров холина. Полученные результаты исследования согласуются и с нашими предыдущими исследованиями [9, 10] относительно изменения РДК ТТГ и ТГ при спинальных и тиреоидных патологиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Авакян А. Э., Топузьян В. О., Хачатрян Т. С.* Ультрафиолетовое излучение и эфиры холина при манифестном гипотиреозе у крыс. Исследования в области естественных наук. Май 2014. № 5 [Электронный ресурс]. URL: <http://science.snauka.ru/2014/05/6772>.
2. *Каладзе Н. Н., Кадала Р. В.* Травматическая болезнь спинного мозга и остеопороз. Вестник физиотерапии и курортологии, 1, с. 81-84, 2005.
3. *Крылов А. А., Песонина С. П., Крылова Г. С.* Гомеопатия для врачей общей практики. Изд. "ПИТЕР", 398 с., 1997.
4. *Матинян Л. А., Хачатрян Т. С., Киприян Т. К., Арутюнян Э. Ю., Авакян А. Э.* Влияние трипсина, химотрипсина, лидазы на вызванную активность повреждённых травмой одиночных мотонейронов спинного мозга крыс. Вестник МАНЭБ, 13, 4, вып. 1., с. 117-120, 2008.
5. *Мнджоян О. Л., Топузьян В. О.* Методы синтеза и свойства β -диметиламиноэтиловых и холиновых эфиров аминокислот и пептидов. Успехи химии., 10, 12, с. 2198-2211, 1981.

6. *Топузян В.О.* Синтез физиологически активных соединений на основе α,β -дегидро-аминокислот и пептидов. Хим. журн. Армении, 60, 4, с. 731-748, 2007,
7. *Хачатрян Т.С.* Изменение концентрации тиреотропного гормона гипофиза и тиреоидных гормонов в крови у шестимесечных крыс при гипотиреозе. Биолог. журн. Армении, 65, 1, с. 89-92, 2013.
8. *Хачатрян Т.С.* Протекция тироксином изменений вызванной активности повреждённых травмой одиночных мотонейронов спинного мозга крыс. Биолог. журн. Армении, LX, с. 64-67, 2008.
9. *Хачатрян Т.С., Геворкян Г.А.* Роль галармина при манифестном гипотиреозе у крыс. Мед. наука Армении, LV, 3, с. 47-50, 2015.
10. *Хачатрян Т.С., Топузян В.О., Геворкян Г.А.* Эффекты галармина и эфиров холина в изменении концентрации тиреотропного и тиреоидных гормонов в крови при гемисекции спинного мозга и разрушении супрахиазматического ядра гипоталамуса у крыс. Мед. наука Армении, LV, 1, с. 25-35, 2015.
11. *Широкова В.И., Голоденко В.И., Демин В.Ф.* Йодная недостаточность: диагностика и коррекция. Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского, 6, с. 68-72, 2005.
12. *Шлапак И.П., Баран Ю.В., Лисянский М.С.* Спинальная травма: патофизиологические и клинические аспекты. Український медичний часопис, 5, с. 39-44, 2002.
13. *Genovese T., Esposito E., Mazzon E., Di Paola R., Caminiti R., Bramanti P., Cappalani A., Cuzzocrea S.* Absence of endogenous interleukin-10 enhances secondary inflammatory process after spinal cord compression injury in mice. J. Neurochem., 6, 108, pp. 1360-1372, 2009.
14. *Grigoryan H.A., Hambardzumyan A.A., Mkrtchyan M.V., Topuzyan V.O., Halebyan G.P., Asatryan R.S.* α,β -Dehydrophenylalanine choline esters, a new class of reversible inhibitors of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. J. Chem. Biol. Interact., 1, 171, pp. 108-116, 2008.
15. *Tator C.H.* Acute management of spinal cord injury. Br. J. Surg., 77, 5, pp. 485-486, 1990.
16. *Tator C.H.* Update on the pathophysiology and pathology of acute spinal cord injury. J. Brain Pathol., 5, 4, pp. 407-413, 1995.
17. *Tator C.H., Duncan E.G., Edmonds V.E., Lapczak L.I., Andrews D.F.* Complications and costs of management of acute spinal cord injury. J. Paraplegia, 31, 11, pp. 700-714, 1993.
18. *Tator C.H., Rowed D.W.* Current concepts in the immediate management of acute spinal cord injuries. Can. Med. Assoc. J., 21, 11, pp. 1453-1464, 1979.
19. *Tator C.H., van der Jagt R.H., Malkin A.* The effect of acute spinal cord compression injury on thyroid function in the rat. J. Surg. Neurol., 18, 1, pp. 64-68, 1982.
20. *Wémeau J.L., Lefebvre J., Linquette M.* "Low triiodothyronine (T3) syndrome": "thyroxine (T4) euthyroidism" evidence (author's transl). J. Nouv. Presse Med., 8, 6, pp. 415-419, 1979.

Поступила 12.11.2015



Biol. Journal of Armenia, 2 (68), 2016

INCESSANT CYCLES OF DYSTROPHIC MYOFIBER DEGENERATION AND REGENERATION RESULT IN UBIQUITOUS CENTRALLY- NUCLEATED FIBERS IN SKELETAL MUSCLES OF X-CHROMOSOME-LINKED MUSCULAR DYSTROPHY (MDX) MOUSE

Y.H. SAPONJIAN

*Institute of Molecular Biology, National Academy of Sciences of the Republic of Armenia,
Yerevan, Armenia / Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA / Department of
Neurology, Massachusetts General Hospital, Boston, Massachusetts, USA
Saponjian.Yero@MGH.Harvard.edu*

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is an X-linked recessive, degenerative disorder and is the most prevalent, devastating and fatal pediatric neuromuscular disorder in the world. DMD is primarily caused by loss-of-function mutations in the dystrophin gene that result in either partial and dysfunctional domains in dystrophin protein or complete absence of it, leading to contraction-induced necrosis of skeletal muscle fibers and eventual replacement with adipose and connective tissue. Ultimately, rapid and subjugating progression of myofiber degeneration and necrosis, along with gradual attenuation and failure of regenerative capacity, rather than failure of muscle development, result in the crippling phenotype of DMD. The X-chromosome-linked muscular dystrophy (*mdx*) mouse is genetically homologous to human DMD but exhibits a milder phenotype and evades severe end-stage histopathology. Histopathologic analysis revealed that skeletal muscles of *mdx* mice exhibit drastically elevated levels of centrally-nucleated myofibers, similar to humans with DMD, as a result of incessant cycles of dystrophic myofiber degeneration and regeneration.

*Duchenne muscular dystrophy – dystrophin – mdx mouse – necrosis - myofiber degeneration
and regeneration – centrally-nucleated fibers*

Դյուշենի մկանային դիստրոֆիան (ԴՄԴ) X-քրոմոսոմի հետ կապված ռեցեսիվ, դեգեներատիվ խանգարում է և աշխարհում ամենատարածված, ամենածանրընթաց ու ամենամահացու մանկական նյարդամկանային հիվանդությունն է: Դիստրոֆին գենի մուտացիաները բերում են դիստրոֆին պրոտեինի բացակայության կամ դիսֆունկցիայի, որը հանգեցնում է կմախքային մկանների մանրաթելերի կրճատմամբ պայմանավորված նեկրոզի և նրանց՝ ճարակ-ցական հյուսվածքներով փոխարինմանը: Ի վերջո, ԴՄԴ-ի անդամալույծ դարձնող բարդ ֆենո-տիպը պայմանավորված է ոչ թե մկանների թերզարգացմամբ, այլ մկանների արագ զարգացող դեգեներացիայով, նեկրոզով և մկանների ռեգեներացիոն ունակության աստիճանական խախտ-մամբ: X-քրոմոսոմով պայմանավորված մկանային դիստրոֆիայով (*mdx*) մուկը գենետիկորեն համանման է մարդկային ԴՄԴ-ին, բայց ցուցաբերում է ավելի մեղմ ֆենոտիպ և շրջանցում է վերջին փուլին բնորոշ ծանր հիստոպաթոլոգիան: Հիստոպաթոլոգիական վերլուծությունը ցույց տվեց, որ *mdx* մկան կմախքային մկանները, ԴՄԴ-ով հիվանդ երեխաների մկանների նման, պարունակում են խիստ բարձր քանակով կենտրոնական կորիզով մանրաթելեր, ինչը վկայում է դիստրոֆիկ մկաններում անընդհատ կրկնվող դեգեներատիվ և ռեգեներատիվ ցիկլերի մասին:

*Դյուշենի մկանային դիստրոֆիա – դիստրոֆին – mdx մուկ – նեկրոզ – մկանաթելերի դեգեներացիա
և ռեգեներացիա – կենտրոնական կորիզով մանրաթելեր*

Мышечная дистрофия Дюшенна (МДД) является рецессивным дегенеративным расстройством, сцепленным с X-хромосомой, и самым распространенным, тяжелотекущим и смертельным педиатрическим нервно-мышечным заболеванием в мире. При МДД мутации гена дистрофина приводят к частичной или полной дисфункции протеина дистрофина или к его отсутствию вообще, в результате чего развивается некроз волокон скелетных мышц, обусловленный их сокращением, и перерождение их в жировую и соединительную ткань. В итоге инвалидизирующий фенотип МДД обусловлен не недоразвитием мышц, а их быстропрогрессирующей дегенерацией и некрозом и постепенной потерей регенерационной способности мышц. Модель мышцы с мышечной дистрофией, сцепленной с X-хромосомой (*mdx*), генетически гомологична МДД человека, но проявляется менее выраженным фенотипом и обходит тяжелую гистопатологию, характерную для конечной стадии болезни. Гистопатологический анализ показал, что скелетные мышцы *mdx* мыши имеют резко повышенный уровень центральоядерных мышечных волокон, как и у больных МДД детей, что является результатом непрерывно повторяющихся циклов дегенерации и регенерации дистрофических мышечных волокон.

Мышечная дистрофия Дюшенна – дистрофин – mdx мышшь – некроз – дегенерация и регенерация мышечных волокон – центральоядерные мышечные волокна

Duchene muscular dystrophy (DMD), an X-chromosome-linked recessive disorder, is the world's most common, severe, and lethal pediatric neuromuscular disorder [9, 10, 15, 17]. It is caused by loss-of-function mutations, mainly large-scale deletions and duplications, in the dystrophin gene that result in either complete absence or loss of critical functional domains of dystrophin protein [10, 15-17]. This initiates a complex cascade of prominent muscular dystrophy events leading to contraction-induced necrosis of skeletal muscle fibers and their eventual replacement with adipose and connective tissue [9, 10, 15-17].

Various animal models of muscular dystrophy have been identified, generated and investigated with the X-chromosome-linked muscular dystrophy (*mdx*) mouse currently being the most highly utilized animal model of DMD [1, 4, 12]. The *mdx* mouse has loss of-function mutation in the highly conserved dystrophin gene (premature stop codon in exon 23) resulting in deficiency of the highly conserved dystrophin protein in muscle thus it is genetically homologous to human DMD [1, 13, 18]. Both *mdx* mice and boys with DMD have striking elevations in serum creatine kinase (SCK) levels and total calcium content in muscle cells [5, 11, 14]. However, *mdx* mice exhibit a more benign clinical phenotype compared to the human disease as they remain reproductively viable, appear behaviorally normal, have near normal life expectancy, exhibit cage activity indistinguishable from wild type mice and do not develop crippling muscle weakness [2, 4, 15].

In the early stages of the disease the human DMD and *mdx* mouse skeletal muscles share common histopathologic characteristics such as incessant cycles of widespread degeneration and necrosis of individual dystrophic muscle fibers with infiltration of macrophages, accompanied by extensive myofiber regeneration, resulting in ubiquitous fiber size variation and large numbers of centrally-nucleated fibers in humans [5, 20]. However, gradual impairment of the dystrophic muscle fiber regenerative capability in humans with DMD results in failure to replace necrotic myofibers, causing fibrosis and progressive decrease in muscle fiber numbers, and eventually resulting in an insufficient number of muscle cells for mobility and respiration [3, 7, 10]. On the contrary, in the later stages the disease process in *mdx*, the mice is considerably milder and less progressive as the characteristic gradual failure of myofiber regenerative capability, extensive connective tissue proliferation and fatty infiltration observed in human DMD muscles are less evident in the *mdx* muscles [2, 5, 6, 8, 19, 20]. Thus, despite undergoing extensive

skeletal muscle degeneration at an early age, the *mdx* mouse somehow mitigates the severe end-stage muscle histopathology seen in humans with DMD [2, 5, 6, 8, 19, 20]. This study presents an in depth analysis of the pathology of gastrocnemius muscles of adult *mdx* mice compared to age-matched wild-type mice.

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

Adult male WT (n = 5) and *mdx* (n=5) mice were euthanized at 28 weeks of age via carbon dioxide inhalation and cervical dislocation. Skeletal muscles were excised and embedded in Tissue-Tek O.C.T. compound (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA) and frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for cryosectioning. Ten micron-thick (10µm) gastrocnemius muscle transverse mid-belly cross-sections, obtained at -22°C with a Microm HM505E cryostat (Microm International GmbH, Walldorf, Germany), were collected onto Tissue Path Superfrost Plus Gold slides (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and stored at -80°C in a Revco Ultima II freezer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) until analysis.

Hematoxylin and Eosin (H&E) staining was carried out on gastrocnemius muscle cryosections from all mice. Formaldehyde-fixed cryosections were re-hydrated in graded alcohols (ice-cold 100% ethanol for 60 s, 95% ethanol for 60 s, 70% ethanol for 60 s, and 50% ethanol for 60 s), and washed in distilled water (3 times, 60 s each). All slices were then sequentially immersed in Mayer's Hematoxylin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 20 s followed by distilled water, Bluing Reagent (Lerner Labs, Pittsburgh, PA, USA), 70% ethanol, and Eosin Y (Acros Organics, Geel, Belgium) for 30 s each. Afterwards, all slices were dehydrated in graded alcohols (50% ethanol, 70% ethanol, 95% ethanol (2 separate rounds), and 100% ethanol (2 separate round) for 30 s each) and lastly cleared in Xylenes (Fisher Scientific) for 5 min. The H&E-stained slices were then cover-slipped with Permount mounting media (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and imaged, keeping imaging parameters identical across all images. All H&E-stained slice images were analyzed for centrally-located nuclei with the entire field of each 10X-magnification image used during analyses.

All images were captured on a Nikon Eclipse 80i fluorescent microscope (Nikon Instruments, Tokyo, Japan) equipped with a Retiga 4000R Q-Imaging CCD Camera (North Central Instruments, Plymouth, MN, USA). NIS Elements Basic Research 3.0 (Nikon Instruments, Tokyo, Japan), Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA), Adobe Photoshop CS4 Extended (Adobe Systems, San Jose, CA, USA), GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) and SigmaPlot 13 (Systat Software, San Jose, CA, USA) scientific data analysis and graphing software were used for image analyses and figure preparation.

Results and Discussion. H&E-stained skeletal muscles of adult WT mice exhibited a dense arrangement of characteristically uniform muscle fibers with peripherally-located nuclei (fig. 1). By contrast, pathology of age-matched *mdx* skeletal muscles revealed myocytes with predominantly centrally-located nuclei as well as substantial variability in myofiber cross-sectional area. These findings are indicative of various stages of widespread and persistent degeneration and regeneration of muscle fibers. Additionally, skeletal muscles of adult *mdx* mice exhibit more prominent regions connective tissue compared to age-matched WT mice (fig. 1) of fiber degeneration with infiltration of inflammatory cells and increased interstitial connective tissue compared to age-matched WT mice (fig. 1).

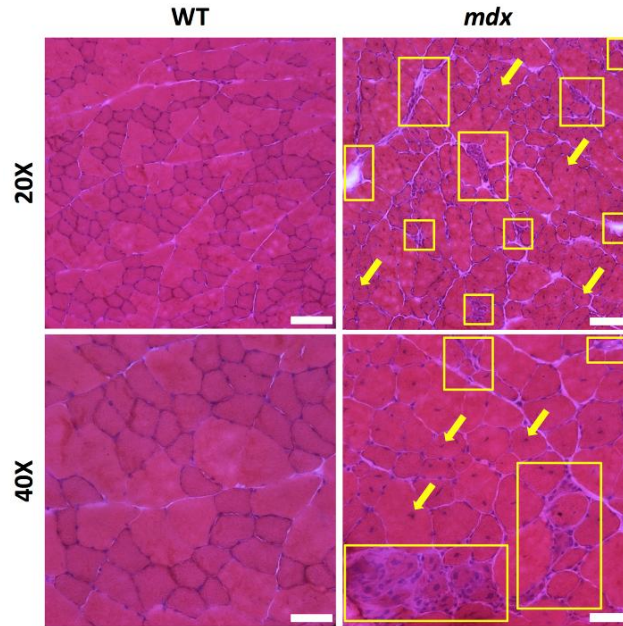


Fig. 1. Histopathology of hematoxylin and eosin-stained gastrocnemius muscles of adult age-matched WT and *mdx* mice. Arrows point to examples of centrally-located nuclei of individual myofibers. Rectangles accentuate areas of necrosis of dystrophic muscle fibers with connective tissue proliferation and fat-tissue infiltration. Scale bar equals 100 μ m for 20X-magnification images and 50 μ m for 40X-magnification images.

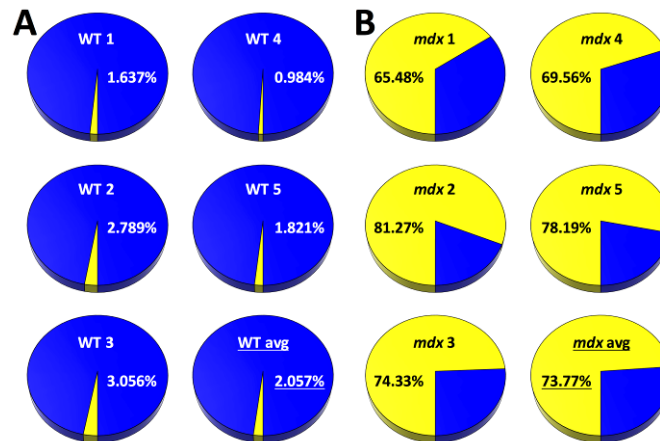


Fig. 2. Drastically elevated number of centrally-nucleated myofibers was identified in gastrocnemius muscles of adult *mdx* mice (B) compared to age-matched WT mice (A).

Quantitation of centrally-nucleated myocytes in H&E-stained cryosections revealed that adult WT mice contained predominantly peripherally-nucleated myofibers in skeletal muscles with centrally-nucleated myofibers representing merely 2% of all fibers (fig. 2A). In contrast, skeletal muscles of age-matched *mdx* mice contained predominantly centrally-nucleated myofibers, representing approximately 74% of all fibers. Thus gastrocnemius muscles of adult *mdx* mice contained 3486% more centrally-nucleated fibers than age-matched WT mice ($p < 0.005$) (fig. 2B).

In summary, histopathologic analysis of centrally-nucleated myocyte counts from H&E-stained skeletal muscles (fig. 1, 2) revealed that adult *mdx* mice exhibit drastically elevated levels of non-peripherally-nucleated muscle fibers compared to age-matched WT mice. This finding, in conjunction with variations in individual fiber size, is indicative of pervasive cycles of dystrophic muscle fiber degeneration and regeneration in skeletal muscles of *mdx* mice, similar to humans with DMD.

REFERENCES

1. Bulfield G., Siller W.G., Wight P.A., Moore K.J. X chromosome-linked muscular dystrophy (*mdx*) in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *81*, 1189-92, 1984.
2. Carnwath J.W., Shotton D.M. Muscular dystrophy in the *mdx* mouse: histopathology of the soleus and extensor digitorum longus muscles. *J. Neurol. Sci.* *80*, 1, 39-54, 1987.
3. Carpenter S., Karpati G. Duchenne muscular dystrophy: plasma membrane loss initiates muscle cell necrosis unless it is repaired. *Brain*, *102*, 1, 147-161, 1979.
4. Cooper B.J. Animal models of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Br. Med. Bull.*, *45*, 3, 703-718, 1989.
5. Coulton G.R., Morgan J.E., Partridge T.A., Sloper J.C. The *mdx* mouse skeletal muscle myopathy: I. A histological, morphometric and biochemical investigation. *Neuropathol Appl. Neurobiol.*, *14*, 1, 53-70, 1988.
6. Cullen M.J., Jaros E. Ultrastructure of the skeletal muscle in the X chromosome-linked dystrophic (*mdx*) mouse. Comparison with Duchenne muscular dystrophy. *Acta Neuropathol.*, *771*, 69-81, 1988.
7. Cullen M.J., Mastaglia F.L. Morphological changes in dystrophic muscle. *Br. Med. Bull.*, *36*, 2, 145-122, 1980.
8. Dangain J., Vrbova G. Muscle development in *mdx* mutant mice. *Muscle Nerve*, *7*, 9, 700-704, 1984.
9. Dubowitz V. Duchenne muscular dystrophy. In: *Muscle Disorders in Childhood*. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 38-72, 1995.
10. Emery A.E., Muntoni F., Quinlivan R.C. Duchenne Muscular Dystrophy. 4th ed. New York: Oxford University Press, 320, 2015.
11. Glesby M.J., Rosenmann E., Nysten E.G., Wrogemann K. Serum CK, calcium, magnesium, and oxidative phosphorylation in *mdx* mouse muscular dystrophy. *Muscle Nerve* *11*, 8, 852-856, 1988.
12. Hoffman E.P., Brown R.H., Jr., Kunkel L.M. Dystrophin: the protein product of Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*, *51*, 919-28, 1987.
13. Hoffman E.P., Monaco A.P., Feener C.C., Kunkel L.M. Conservation of the Duchenne muscular dystrophy gene in mice and humans. *Science*, *238*, 4825, 347-350, 1987.
14. Jackson M.J., Jones D.A., Edwards R.H. Measurement of calcium and other elements in muscle biopsy samples from patients with Duchenne muscular dystrophy. *Clin. Chim. Acta*, *147*, 3, 215-221, 1985.
15. Karpati G., Hilton-Jones D., Griggs R.C. *Disorders of Voluntary Muscle*. Cambridge: Cambridge University Press, 790, 2001.
16. Muntoni F., Torelli S., Ferlini A. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol.* *2*, 731-40, 2003.
17. Roberts R.G. Dystrophin, its gene, and the dystrophinopathies. *Adv. Genet.*, *33*, 177-231, 1995.
18. Sicinski P., Geng Y., Ryder-Cook A.S., Barnard E.A., Darlison M.G., Barnard P.J. The molecular basis of muscular dystrophy in the *mdx* mouse: a point mutation. *Science*, *244*, 1578-80, 1989.
19. Tanabe Y., Esaki K., Nomura T. Skeletal muscle pathology in X chromosome-linked muscular dystrophy (*mdx*) mouse. *Acta Neuropathol.*, *69*, 1-2, 91-95, 1986.
20. Torres L.F., Duchon L.W. The mutant *mdx*: inherited myopathy in the mouse. Morphological studies of nerves, muscles and end-plates. *Brain*, *110*, 2, 269-299, 1987.

Received on 24.02.2016



Биол. журн. Армении, 2 (68), 2016

К ХАРАКТЕРИСТИКЕ БЕЛКОВЫХ И ЛИПИДНЫХ КОМПОНЕНТОВ ПРОТЕОЛИПИДОВ ИЗ МИТОХОНДРИЙ КЛЕТОК РАЗНЫХ ОРГАНОВ КРЫСЫ

К.Г. МАНУКЯН, А.А. СТЕПАНЯН, К.Л. ЛЕВОНЯН,
Т.И. КАЗАРЯН, Л.Г. КИРАКОСЯН

Институт биохимии им. Г.Х.Бунятына НАН РА
rafael-nelly@mail.ru

Изучали особенности белковых и липидных (фосфолипидных) компонентов протеолипидов (ПЛ), выделенных из митохондрий клеток различных органов крысы: головной мозг (кора мозга), сердце, печень, почка. В составе митохондрий клеток коры мозга выявлены в основном два белка с молекулярной массой I – 35,43 кДа; II – 16,48 кДа. Обнаружена только одна пара терминальных аминокислот: N-концевая аспарагиновая кислота и C-концевой лизин. Показано, что для ПЛ всех изученных митохондрий характерно высокое содержание типично митохондриального фосфолипида – дифосфатидилглицерина (кардиолипина) в составе связанных с ПЛ белками фосфолипидов. В более прочносвязанной с ПЛ белками фракции липидов митохондрий клеток коры головного мозга и сердца превалировал только этот фосфолипид, тогда как эта же фракция липидов из ПЛ митохондрий клеток печени и почки характеризовалась преобладанием двух кислых фосфолипидов: дифосфатидилглицерина и фосфатидилинозита.

*Митохондрии клеток разных органов – протеолипиды – белковые компоненты –
фосфолипидные компоненты*

Ուսումնասիրվել են առնետի տարբեր օրգանների՝ գլխուղեղի կեղևի, սրտի, լյարդի, երիկամի բջիջների միտոքոնդրիումներից անջատած պրոտեոլիպիդների (ՊԼ) սպիտակուցային և լիպիդային (ֆոսֆոլիպիդային) բաղադրիչների առանձնահատկությունները: Գլխուղեղի կեղևի բջիջներից ստացված միտոքոնդրիումների ՊԼ-ի կազմում հայտնաբերվել են հիմնականում երկու I – 35,43 կԴա, II – 16,48 կԴա մոլեկուլային զանգված ունեցող սպիտակուցներ: Հայտնաբերվել է ծայրային ամինաթթուների միայն մեկ զույգ՝ N-ծայրային ասպարագինաթթու և C-ծայրային լիզին: Ցույց է տրվել, որ բոլոր ուսումնասիրված օրգանների բջիջների միտոքոնդրիումներից ստացված ՊԼ-ի համար բնորոշ է տիպիկ միտոքոնդրիումային ֆոսֆոլիպիդի՝ դիֆոսֆատիդիլգլիցերինի (կարդիոլիպինի) բարձր պարունակությունը ՊԼ-սպիտակուցների հետ կապված ֆոսֆոլիպիդների կազմում: Գլխուղեղի կեղևի և սրտի բջիջների միտոքոնդրիումների ՊԼ-ի սպիտակուցների հետ ավելի ամուր կապված լիպիդների ֆրակցիայում միայն այդ ֆոսֆոլիպիդն է գերակշռում, մինչդեռ լյարդի և երիկամի ՊԼ-ի հետ կապված լիպիդների նույն ֆրակցիան բնութագրվում է երկու թթու ֆոսֆոլիպիդի՝ դիֆոսֆատիդիլգլիցերինի և ֆոսֆատիդիլինոզիտի բարձր պարունակությամբ:

*Տարբեր օրգանների բջիջների միտոքոնդրիումներ – պրոտեոլիպիդներ –
սպիտակուցային բաղադրիչներ – ֆոսֆոլիպիդային բաղադրիչներ*

Some specific features of protein and lipid (phospholipid) components of proteolipids (PL) isolated from mitochondria of rat different organs – brain cortex, heart, liver, kidney cells were studied. In composition of PLs from brain cortex cells mitochondria two proteins with a molecular

mass of I – 35,43 kDa; II – 16,48 kDa were revealed. Only one pair of terminal amino acids: N – terminal aspartic acid and C-terminal lysine was found. PLs of all studied mitochondria preparations were characterized by high concentration of typical mitochondrial phospholipid – diphosphatidylglycerol (cardiolipin). In tightly bounded with PL lipid fractions of brain cortex and heart cells mitochondria only this one phospholipid was predominating, while the same fractions of PLs from liver and kidney cells mitochondria were characterized by predominance of two acidic phospholipids: diphosphatidylglycerol and phosphatidylinositol.

*Mitochondria of different organs cells – proteolipids – protein components –
phospholipid components*

Широко распространённые, типично внутренние гидрофобные мембранные белки – протеолипиды (ПЛ), связанные с липидами, являются необходимыми компонентами клеточных мембран животных, растительных и микробных клеток [5, 16]. Особенно богата ПЛ нервная ткань, где они локализованы в основном в миелине [5, 6, 16], однако в небольших количествах входят в состав также других субклеточных образований нервной ткани [5, 8]. В клетках других органов, особенно сердца, которое после мозга наиболее богато ПЛ, они являются главным образом компонентами митохондрий [3, 18], хотя в определённых количествах обнаружены в составе и других субклеточных структур. В настоящее время очевидно, что, наряду со структурной стабилизацией мембран, ПЛ участвуют в ряде важных клеточных функций, связанных с мембранами, в частности, митохондриальными. Митохондрии играют решающую роль в различных клеточных процессах, включая продукцию большей части биологической энергии: β окисление жирных кислот, цикл мочевины, программированную гибель клеток – апоптоз и т.д. [10]. Будучи структурными компонентами митохондриальных мембран (в основном внутренней мембраны митохондрий), ПЛ принимают участие в основных функциях этих органелл. ПЛ связаны с синтезом АТФ в митохондриях, так как участвуют в формировании протонпроводящей и фосфатсвязывающей субъединиц мембранного F_0 фрагмента митохондриальной H^+ -АТФазы (F-типа АТФазы) [2, 9, 12]. Фермент пересекает внутреннюю мембрану митохондрий и образует АТФ из АДФ в присутствии протонного градиента через мембрану, который генерируется электрон-транспортными комплексами дыхательной цепи. АТФазы F-типа состоят из двух структурных доменов – F_1 , который содержит экстрамембранное каталитическое ядро, и F_0 – содержит трансмембранный протонный канал [1, 2, 12].

В связи с вышесказанным, в ходе исследований по изучению характерных особенностей ПЛ, выделенных из различных субклеточных структур нервной и других тканей, представляло интерес изучение особенностей белковых и липидных компонентов ПЛ из митохондрий клеток различных органов, отличающихся по структуре и функциям (коры головного мозга, сердца, печени, почки), что и явилось задачей настоящей работы. Ранее нами было показано, что в наибольших количествах и более прочно с ПЛ белками (ПЛБ) связаны фосфолипиды [5]. В связи с этим наряду с некоторыми характеристиками белковых компонентов изучали качественный состав и количественное содержание фосфолипидов во фракциях липидов, менее и более прочно связанных с ПЛБ митохондрий клеток различных органов. Следует отметить, что связанные с белками липиды играют немаловажную роль в сохранении конформационной целостности ассоциированных с ними мембранных белков и в осуществлении их функций [19].

Материал и методика. Опыты ставили на беспородных белых крысах массой 180-200 г. Крыс декапитировали под лёгким эфирным наркозом. Головной мозг быстро извлекали и помещали на лёд. Печень *in situ* перфузировали через воротную вену 0,15 М охлаждённым раствором KCl и средой выделения до светло-жёлтого цвета, затем извлекали из брюшной полости, одновременно извлекали сердце и почки. Все органы хранили при 0-4°C. Митохондрии клеток различных органов выделяли согласно известным методам с некоторыми внесёнными нами изменениями. **Кора головного мозга.** Большие полушария головного мозга тщательно очищали от крови и мозговых оболочек, используя 0,9%-ный охлаждённый раствор NaCl. Кору мозга снимали со всей поверхности больших полушарий, размельчали и гомогенизировали в 10-кратном объёме 0,32 М раствора сахарозы. Выделение митохондрий клеток мозга проводили согласно схеме, описанной ранее [8]. **Сердце.** Удаляли предсердия, сосуды, жир, мышцу желудочков многократно промывали 0,1 М раствором KCl и средой выделения, обсушивали, тщательно измельчали, пропускали через давилку и гомогенизировали в 10-ти объёмах 0,44 М раствора сахарозы, содержащего 0,001 М EDTA, pH 7,4. Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования [4]. **Печень.** Освобождали от оболочек, жировой, соединительной ткани, размельчали, тщательно промывали 0,15 М раствором KCl и средой выделения, обсушивали и гомогенизировали в 10-ти объёмах 0,25 М раствора сахарозы, содержащего 0,001 М EDTA, pH 7,4. **Почка.** Освобождали от капсулы, удаляли лоханку, тщательно измельчали, кашицу промывали несколько раз средой выделения, обсушивали, гомогенизировали в 10-ти объёмах 0,44 М раствора сахарозы, содержащего 0,001 М EDTA, pH 7,4 (наша модификация). Митохондрии клеток печени и почки выделяли согласно методу [11].

Липидные экстракты митохондрий клеток различных органов получали и отмывали методами, описанными ранее [6, 8]. Выделение ПЛ и дальнейший анализ их белковых и липидных компонентов проводили в соответствии с ранее описанными методами [17].

Статистическую обработку результатов проводили по критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Согласно полученным данным, содержание ПЛБ в общих липидных экстрактах митохондрий клеток различных органов влажной ткани составляло в мг/г: $0,44 \pm 0,02$ (13) – в коре мозга; $0,56 \pm 0,03$ (11) – в сердце; $0,35 \pm 0,03$ (6) – в почке и $0,16 \pm 0,01$ (6) – в печени.

При диск-электрофорезе в ПААГ с ДДС-Na [6] ПЛБ из митохондрий клеток коры мозга были обнаружены две основные полосы. Первая, хорошо выраженная, интенсивно окрашенная, соответствующая белку с молекулярной массой $35,43 \pm 0,30$ (30) кДа – I и вторая, тоже хорошо выраженная, соответствующая белку с молекулярной массой – $16,48 \pm 0,27$ (20) кДа – II (рис. 1).

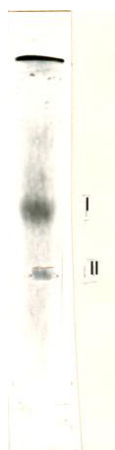


Рис. 1. Диск-электрофореграмма препарата ПЛБ из митохондрий клеток коры мозга крысы. I – белок с Mr 35,43 кДа, II – белок с Mr 16,48 кДа.

Следует отметить, что митохондриальные ПЛ склонны к сильной агрегации и при электрофоретическом разделении ведут себя аномально; их подвижность варьирует при разных условиях электрофореза, что очень затрудняет определение молекулярных масс и сравнение результатов разных авторов [1, 16]. В настоящее время наиболее изученным компонентом F_0 фактора является ответственный за транспорт протонов в митохондриях млекопитающих гидрофобный низкомолекулярный белок с молекулярной массой 8,0 кДа, способный специфически ковалентно присоединять NN' -дициклогексилкарбодиимид (ДССД) – ингибитор АТФазы. Этот ДССД связывающий белок является субъединицей “с” F_0 домена [15]. Исследования разных авторов [9, 14] показали присутствие двух различных конформационных состояний этого ПЛ в F_0 млекопитающих (мономера с молекулярной массой 8,0 кДа и димера с молекулярной массой 17,6 – 18,0 кДа), которые сохранялись в растворах ДДС-Na, но давали разные картины разделения в различных системах ПААГ с ДДС-Na. Поскольку при разделении в системе [20] с Na-фосфатным буфером, которая применялась и в наших опытах, определялась только димерная форма, можно предположить, что обнаруженный нами в составе ПЛ митохондрий клеток коры мозга более низкомолекулярный белок с молекулярной массой 16,48 кДа соответствует димеру ДССД связывающего белка. Что касается белка с молекулярной массой 35,43 кДа, то в силу склонности ПЛ митохондрий к агрегации и образованию олигомеров, можно предположить, что это результат агрегации низкомолекулярных белков. В пользу данного предположения свидетельствует и тот факт, что, несмотря на наличие двух основных полос на электрофореграммах, только одна пара концевых аминокислот – N-концевая аспарагиновая и C-концевой лизин были обнаружены при исследовании ПЛБ из свободных и синаптических митохондрий клеток коры мозга крысы [3].

Как отмечалось выше, основной задачей настоящей работы являлось выделение ПЛ из митохондрий клеток различных органов крысы в виде цельных растворимых липидно-белковых комплексов, “очищенных” в разной степени от липидов, и исследование, наряду с некоторыми характеристиками белковых компонентов, качественного состава и количественного содержания фракций, менее и более прочно связанных с ПЛБ фосфолипидов. Параллельно определяли фосфолипидный состав общих липидных экстрактов изучаемых препаратов митохондрий. Полученные результаты представлены в табл. 1, 2, 3, 4. Как видно из таблиц, суммарное содержание фосфолипидов в общих липидных экстрактах митохондрий клеток различных органов крысы было примерно одинаковым, только в препаратах митохондрий клеток коры мозга оно было несколько выше. Однако митохондрии клеток различных органов заметно отличались по процентному содержанию нейтральных и особенно кислых фосфолипидов (табл. 1, 2, 3, 4).

В настоящем сообщении приведены только данные для препаратов ПЛ, промытых смесью спирт+эфир 1:1 при +23°C [17]. Как видно из таблиц, фосфолипиды выделенных нами препаратов ПЛ митохондрий клеток различных органов составляли 39,55-47,85% от массы неочищенных ПЛ (НПЛ), которые содержат весь комплекс менее и более прочно связанных с ПЛБ липидов и 10,91-13,88% от массы “очищенных” ПЛ (ОПЛ), полученных в результате промывания НПЛ спирто-эфирной смесью при +23°C и содержащих фракцию более прочно связанных липидов [17]. По своему фосфолипидному составу НПЛ митохондрий клеток различных органов были в общем сходны со своими общими липидными экстрактами, только содержание дифосфатидилглицерина в НПЛ было несколько выше. Наряду со сходством, наблюдались совершенно определённые различия в фосфолипидном составе менее и особенно более прочно связанных с ПЛБ липидных фракций митохондрий клеток различных органов.

Таблица 1. Содержание отдельных фосфолипидов общего липидного экстракта, НПЛ, спиртоэфирных экстрактов НПЛ (менее прочно связанная фракция) и ОПЛ (более прочно связанная фракция) митохондрий коры мозга крысы, % Р от суммы Р фосфолипидов каждой фракции (M±m)

Фосфолипиды	Общий липидный экстракт	НПЛ	Спирто-эфирные экстракты НПЛ (менее прочно связанная фракция)	ОПЛ (более прочно связанная фракция)
Фосфатидилинозит	3,28±0,57 (4)	3,29	2,62±2,17(7)	11,26±0,66(8)
Фосфатидилсерин	6,24±0,51(6)	7,75	7,12±0,72(5)	15,23±1,32(8)
Дифосфатидилглицерин	8,61±1,06(7)	12,53	10,46±1,89(6)	37,09±3,31(6)
Фосфатидная кислота	0,83±0,07(5)	1,03	0,45±0 (3)	7,95±1,32(4)
Фосфатидилхолин	41,19±2,24(7)	36,34	38,45±2,50(7)	11,26±0,66(7)
Сфингомиелин	2,59±0,17(4)	4,16	4,17±0,44(5)	3,97±0,66(4)
Фосфотидилэтанолламин	34,73±1,42(7)	31,67	33,61±2,00(7)	8,61±0,66(8)
Лизофосфатидилхолин	1,53±0,16(3)	1,69	1,73±0,33(4)	1,32±0(3)
Лизофосфатидил-этанолламин	1,00±0,20(2)	1,54	1,39±0(2)	3,31±0,66(3)
Кислые фосфолипиды	18,96	24,60	20,65	71,53
Нейтральные фосфолипиды	81,04	75,40	79,35	28,47
Сумма фосфолипидов (γР/г влажной массы ткани)	88,11	19,48	17,97	1,51
Фосфолипиды в мг/100 мг массы ПЛ фракции	-	42,72	39,41	13,98

Таблица 2. Содержание отдельных фосфолипидов общего липидного экстракта, НПЛ, спиртоэфирных экстрактов НПЛ (менее прочно связанная фракция) и ОПЛ (более прочно связанная фракция) митохондрий сердца крысы, % Р от суммы Р фосфолипидов каждой фракции (M±m)

Фосфолипиды	Общий липидный экстракт	НПЛ	Спирто-эфирные экстракты НПЛ (менее прочно связанная фракция)	ОПЛ (более прочно связанная фракция)
Фосфатидилинозит	3,28±0,40 (6)	3,87	3,24±0,15(2)	12,50±1,39(4)
Фосфатидилсерин	1,12±0,24(6)	1,51	0,71±0,15(2)	12,50±0,69(2)
Дифосфатидилглицерин	15,01±1,53(6)	17,50	15,94±2,43(3)	38,89±5,56(4)
Фосфатидная кислота	0,87±0,14(2)	1,08	0,61±0,10 (3)	7,64±1,39(3)
Фосфатидилхолин	40,61±0,90(5)	36,93	38,82±3,09(4)	11,11±0,69(4)
Сфингомиелин	1,80±0,30(5)	1,51	1,32±0,10(3)	4,17
Фосфатидилэтанолламин	35,22±1,52(5)	35,19	37,24±0,25(4)	6,94±1,39(4)
Лизофасфатидилхолин	1,06±0,22(3)	0,90	0,96±0,1(3)	-
Лизофосфатидил-этанолламин	1,03±0,09(2)	1,51	1,16±0,05(3)	6,25±1,39(3)
Кислые фосфолипиды	20,28	23,96	20,50	71,53
Нейтральные фосфолипиды	79,72	76,04	79,50	28,47
Сумма фосфолипидов (γР/г влажной массы ткани)	63,34	21,20	19,76	1,44
Фосфолипиды в мг/100 мг ПЛ фракции	-	39,55	36,86	10,91

Менее прочно с ПЛБ всех изученных препаратов митохондрий были связаны нейтральные фосфолипиды: фосфатидилхолин, фосфатидилэтанолламин и сфингомиелин, которые в сумме составляли 79,35-84,6% всех менее прочно связанных фосфолипидов. На долю кислых фосфолипидов этой фракции приходилось 15,40-20,65%. Следует отметить, что фосфолипидный состав менее прочно связанных с ПЛБ липидных фракций митохондрий клеток всех изученных органов был в общем сходен с фосфолипидным составом соответствующих общих липидных экстрактов

(табл.1,2,3,4). Последовательное промывание НПЛ спирто-эфирной смесью при -12°C и $+23^{\circ}\text{C}$ [17] приводило к постепенной экстракции менее прочно связанных нейтральных фосфолипидов и концентрированию более прочно связанных кислых фосфолипидов. С полученными в результате ОПЛ были связаны в основном кислые фосфолипиды, составлявшие 68,81-73,73% от общей суммы более прочно связанных фосфолипидов.

Таблица 3. Содержание отдельных фосфолипидов общего липидного экстракта, НПЛ, спиртоэфирных экстрактов НПЛ (менее прочно связанная фракция) и ОПЛ (более прочно связанная фракция) митохондрий печени крысы, % Р от суммы Р фосфолипидов каждой фракции, $M \pm m$

Фосфолипиды	Общий липидный экстракт	НПЛ	Спирто-эфирные экстракты НПЛ (менее прочно связанная фракция)	ОПЛ (более прочно связанная фракция)
Фосфатидилинозит	$8,11 \pm 1,31 (3)$	7,92	$6,24 \pm 1,29 (4)$	$28,81 \pm 3,39 (4)$
Фосфатидилсерин	$1,52 \pm 0,16 (4)$	1,63	$0,88 \pm 0,07 (3)$	$11,02 \pm 0,85 (3)$
Дифосфатидилглицерин	$6,31 \pm 0,78 (4)$	9,36	$7,87 \pm 0,81 (4)$	$27,97 \pm 1,70 (4)$
Фосфатидная кислота	$0,79 \pm 0,11 (3)$	0,82	$0,41 \pm 0,07 (2)$	$5,93 \pm 0,08 (4)$
Фосфатидилхолин	$52,88 \pm 1,76 (4)$	51,82	$55,09 \pm 5,83 (4)$	$11,02 \pm 1,70 (4)$
Сфингомиелин	$2,38 \pm 0,40 (4)$	2,45	$2,64 \pm 0,34 (3)$	-
Фосфатидилэтаноламин	$23,50 \pm 0,30 (4)$	23,24	$24,36 \pm 1,76 (3)$	$9,32 \pm 1,70 (4)$
Лизофосфатидилхолин	$2,11 (1)$	2,20	$1,90 (1)$	$5,93 \pm 0,85 (2)$
Лизофосфатидил-этаноламин	$2,40 \pm 0,37 (2)$	0,56	$0,61 \pm 0,27 (2)$	-
Кислые фосфолипиды	16,73	19,73	15,40	73,73
Нейтральные фосфолипиды	83,27	80,27	84,60	26,27
Сумма фосфолипидов ($\gamma\text{P}/\text{г}$ влажной массы ткани)	69,69	15,92	14,74	1,18
Фосфолипиды в $\text{мг}/100 \text{ мг}$ ПЛ фракции	-	44,22	40,94	11,80

Митохондрии клеток всех изученных органов характеризовались высоким содержанием типично митохондриального фосфолипида-дифосфатидилглицерина во фракции более прочно связанных с ПЛБ фосфолипидов (табл.1, 2, 3, 4). В митохондриях клеток коры мозга и сердца превалировал только этот кислый фосфолипид, составляя 37,09% и 38,89% от суммы всех более прочно связанных фосфолипидов соответственно (табл.1, 2). В ПЛ митохондрий клеток коры мозга было сравнительно высоким и содержание более прочно связанного фосфатидилсерина – 15,83% (табл.1), в митохондриях клеток сердца – 12,50% (табл.2). В отличие от митохондрий клеток мозга и сердца, фракция более прочно связанных с ПЛБ фосфолипидов митохондрий клеток печени характеризовалась преобладанием двух кислых фосфолипидов – дифосфатидилглицерина и фосфатидилинозита, которые составляли 27,97% и 28,81% от суммы всех прочно связанных фосфолипидов соответственно (табл. 3). Те же два кислых фосфолипида – дифосфатидилглицерин и фосфатидилинозит превалировали и в более прочно связанной с ПЛБ липидной фракции ПЛ из митохондрий клеток почки, однако содержание первого – 29,92% было здесь примерно в 1,4 раза выше, чем второго – 21,80% (табл.4).

Таким образом, проведенные исследования выявили некоторые характерные особенности фосфолипидного состава ПЛ из митохондрий клеток различных органов. Результаты показали, что имеется совершенно определенное сходство между ПЛ митохондрий клеток коры мозга и сердца, с одной стороны, и ПЛ митохондрий клеток печени и почки – с другой. Различия между препаратами митохондрий клеток исследованных органов были обусловлены превалированием в ли-

пидных фракциях, как менее, так и особенно более прочно связанных с ПЛБ одного (дифосфатидилглицерин) или двух (дифосфатидилглицерин, фосфатидилинозит) кислых фосфолипидов.

Таблица 4. Содержание отдельных фосфолипидов общего липидного экстракта, НПЛ, спиртоэфирных экстрактов НПЛ (менее прочно связанная фракция) и ОПЛ (более прочно связанная фракция) митохондрий почки крысы, % Р от суммы Р фосфолипидов каждой фракции, М±m

Фосфолипиды	Общий липидный экстракт	НПЛ	Спирто-эфирные экстракты НПЛ (менее прочно связанная фракция)	ОПЛ (более прочно связанная фракция)
Фосфатидилинозит	5,95±1,02 (3)	6,72	5,39±0,42(3)	21,80±2,56(3)
Фосфатидилсерин	2,88±0,34(3)	3,20	2,43±0,42(3)	11,97±1,71(3)
Дифосфатидилглицерин	10,40±1,16(3)	11,32	9,67±1,56(3)	29,92±3,42(3)
Фосфатидная кислота	1,77(1)	1,12	0,76 (1)	5,12±0,42(2)
Фосфатидилхолин	34,70±3,89(3)	36,75	38,98±2,31(2)	11,54±0,00(2)
Сфингомиелин	5,99±0,72(3)	7,14	7,24±1,37(3)	5,98±0,86(2)
Фосфатидилэтаноламин	33,96±3,69(3)	32,25	34,13±3,91(3)	11,11±1,28(2)
Лизофосфатидилхолин	1,45±0,27(2)	1,29	1,40±0,23(2)	-
Лизофосфатидил-этаноламин	2,90(1)	0,21	-	2,56(1)
Кислые фосфолипиды	21,00	22,36	18,25	68,81
Нейтральные фосфолипиды	79,00	77,64	81,75	31,19
Сумма фосфолипидов (γР/г влажной массы ткани)	69,90	28,71	26,37	2,34
Фосфолипиды в мг/100 мг ПЛ фракции	-	47,85	43,95	13,93

Выявленные различия связаны, вероятно, с особенностями структуры и функции как самих митохондрий, так и клеток тех органов, из которых они выделены. Как показали наши исследования, высокое содержание фосфатидилинозита во фракциях как менее, так особенно более прочно связанных с ПЛБ фосфолипидов, характерно и для ПЛ клеток целой печени, где в более прочно связанной с ПЛБ фракции фосфолипидов на долю фосфатидилинозита приходилось 27,5%, а дифосфатидилглицерина – 19,0%. В клетках коркового слоя почки преобладающим, более прочно связанным с ПЛБ фосфолипидом, являлся дифосфатидилглицерин, составлявший 46% от суммы всех прочно связанных с ПЛБ фосфолипидов, что свидетельствовало о преимущественно митохондриальной локализации ПЛ. Нами также показано, что, в отличие от клеток коркового слоя, в мозговом слое почки наиболее прочно с ПЛБ связаны два кислых фосфолипида: фосфатидилинозит и фосфатидилсерин, составлявшие 37,0% и 34,5% от суммы всех более прочно связанных фосфолипидов соответственно, на долю дифосфатидилглицерина приходилось лишь 7,12% [7]. Полученное в настоящей работе относительно высокое содержание фосфатидилинозита в ПЛ митохондрий клеток почки обусловлено, по-видимому, тем, что мы изучали митохондрии клеток целой почки, а не коркового и мозгового слоёв раздельно. Проведенные исследования показали, что для ПЛ митохондрий клеток всех изученных органов является характерным преобладание в менее и особенно более прочно связанных с ПЛБ фракциях липидов одного или одновременно двух кислых фосфолипидов - дифосфатидилглицерина и фосфатидилинозита. Первому придаётся важная роль в процессах транспорта протонов во внутренней мембране митохондрий [13], а второй является, по-видимому, компонентом ПЛ ионотранспортирующих систем этой же мембраны, которые, наряду с карриер белками, играют ключевую роль в проявлении функций митохондрий и в клеточном гомеостазе [10].

Результаты проведенных исследований подтвердили высказанное нами ранее на основании изучения характерных особенностей ПЛ из различных клеточных мембран заключение о том, что, наряду со сходством, имеется ряд различий не только в белковых, но и липидных (фосфолипидных) компонентах ПЛ разных клеточных мембран в зависимости от локализации ПЛ и их возможной функции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зайцева Г.Н., Яхнин А.В. Протеолипидные комплексы олигомицинчувствительной аденозинтрифосфатазы митохондрий *Cnithidia opcorpelti*. Биохимия, 49, 4, 577-584, 1984.
2. Иващенко А.Г., Карпенюк Т.А., Пономаренко С.В. АТФ-синтаза бактерий, митохондрий и хлоропластов. Свойства мембранного сектора F₀. Биохимия 56, 3, 406-419, 1991.
3. Казарян Т.И., Манукян К.Г. N- и C-концевые аминокислоты протеолипидов головного мозга и некоторых других органов крысы. Украинск. биохим. ж. 60, 3, 71-74, 1988.
4. Коптева Л.А., Бирюзова В.И. Зависимость между функцией разных отделов сердца собак и некоторыми биохимическими и ультраструктурными особенностями митохондрий. Бюлл. экспер. биол. и мед. 7, 19-22, 1968.
5. Манукян К.Г. Липидный компонент протеолипидов разных отделов нервной системы и субклеточных образований мозга. Нейрохимия 1, 2, 51-65, 1982.
6. Манукян К.Г., Киракосян Л.Г., Левонян К.Л., Степанян А.А. О протеолипидах миелина, изолированного из мозга крысы. Вопросы биохимии мозга. Изд. АН АрмССР, 11, 116-128, 1976.
7. Манукян К.Г., Киракосян Л.Г., Левонян К.Л., Казарян Т.И., Степанян А.А. О характерных особенностях фосфолипидного компонента протеолипидов из разных органов крысы. Аннот. докл. III Междунар. симпоз. под эгидой ЮНЕСКО "Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии", посвященного 100-летию со дня рождения академика Н.М. Сисакяна, с.46-47, Москва, Дубна, 2007.
8. Манукян К.Г., Левонян К.Л., Степанян А.А., Киракосян Л.Г., Казарян Т.И. Субклеточное распределение протеолипидов в мозгу крысы. Вопросы биохимии мозга. Изд. АН АрмССР, 12, с.68-80, 1977.
9. Blondin L.A. Resolution of the mitochondrial N, N'-dicyclohexylcarbodiimide binding proteolipid fraction into three similar sized proteins. Biochem. Biophys. Res. Commun. 87, 4, 1087-1094, 1979.
10. DaCruz S., Xsenarios J., Langrindge J., Vilbois F. et al. Proteomic analysis of the mouse liver mitochondrial inner membrane. J. Biol. Chem. 278, 41566-41576, 2003.
11. Clouet P., Bezard J. In vitro conversion of erucic acid by microsomes and mitochondria from liver, kidney and heart of rats. Lipids 14, 3, 268-276, 1979.
12. Fillingame R.H. Coupling H⁺ transport and ATP synthesis in F₁F₀-ATP synthases: glimpses of interacting parts in a dynamic molecular machine. J. Exp. Biol. pt.2, 217-224. 1997.
13. Haines T.H., Dencher N.A. Cardiolipin a proton trap for oxidative phosphorylation. Febs Lett. 528, 1-3, 35-39, 2002.
14. Kopesky Z., Houstek Z., Szarska E., Drahota Z. Electrophoretic behavior of the H⁺-ATPase proteolipid from bovine heart mitochondria. J.Bioenergetics Biomembranes 18, 6, 507-519, 1986.
15. Kramarova T.V., Shatalina I.C., Andersson U. et al. Mitochondrial ATP-synthase levels in brown adipose tissue are governed by the c-Fo subunit P1 isoform. The FASEB Journal, 22, 1, 55-63, 2008.
16. Lees M.B., Sakura D.J., Sapirstein V.S. Curatolo W. Structure and function of proteolipids in myelin and non-myelin membranes. Biochim. Biophys. Acta, 553, 2-3, 96-107, 1979.
17. Manukian K.H., Kazarian T.I., Kirakosian L.G., Stepanian H.A., Levonian K.L. Specific features of protein and lipid moieties of proteolipids from rat brain microsomes. Нейрохимия, 20, 2, 101-104, 2003.
18. Murakami M., Ozawa Y., Funahashi S. Proteolipid from beef heart muscle. II. Chemical composition and subcellular distribution. J.Biochemistry. Japan, 54, 2, 166-172, 1963.
19. Vacher M., Waks M., Nicot C. Myelin proteins in reverse micelles: tight lipid association required for insertion of the Folch P_i proteolipid into a membrane-mimetic system. J. Neurochem., 52, 1, 117-123, 1989.
20. Weber K., Osborn M. The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem., 244, 16, 4406-4412, 1969.

Поступила 24.11.2015



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 2(68), 2016

ԴԵԲԵԴ ԳԵՏԻ ԱՎԱԶԱՆԻ ՓՈՔՐ ՀԻՂՐՈՒՆԵԿՏՐԱԿԱՅԱՆՆԵՐԻ ՁԿՆՈՒԴԻՆԵՐԸ ԵՎ ԴՐԱՆՑ ՆՇԱՆԱԿՈՒԹՅՈՒՆԸ ՁԿՆԱՇԽԱՐՀԻ ՊԱՅՊԱՆՈՒԹՅԱՆ ՀԱՄԱՐ

Ս.Խ. ՊԻՊՈՅԱՆ¹, Ա.Ս. ԱՌԱԲԵԼՅԱՆ², Լ.Գ. ԳԱԼՍՏՅԱՆ³,
Ի.Ս. ԳԱԲԱՅԱՆ⁴

¹Խ. Արուսյանի անվան հայկական պետական մանկավարժական
համալսարան, s.pipoyan@gmail.com

²ՀՀ ԳԱԱ Կենդանաբանության և հիդրոէկոլոգիայի գիտական կենտրոն, Կենդանաբանության
ինստիտուտ, biology.arakelyan@gmail.com

³«Համահայկական քաղաքացիական ճակատ» քաղաքացիական նախաձեռնություն,
armecofront@gmail.com

⁴«Հիդրոէներգետիկա» ՍՊԸ, inessa.gabayan@hydroenergetica.com

Ներկայացված է Դեբեդ գետի ու նրա ավազանին պատկանող առանձին գետերի ձկնաշխարհի կազմը, ինչպես նաև նկարագրված են այդ գետերի վրա կառուցված փոքր հիդրոէլեկտրակայանների ջրառի հանգույցներում տեղակայված ձկնուղիները: Բացահայտվել է, որ վերոգրյալ ձկնուղիների էական մասը չի համապատասխանում այդ գետերում մշտաբնակ, ինչպես նաև պարբերաբար միգրացիաներ կատարող ձկնատեսակների կենսական պահանջմունքներին և ֆիզիկական հնարավորություններին:

Ձկնուղիներ – ձկնաշխարհ – փոքր հիդրոէլեկտրակայաններ – Դեբեդ գետ

Представлен видовой состав рыбного населения р. Дебед и некоторых его притоков, дано описание рыбопропускных сооружений на малых ГЭС, построенных на этих водотоках. Выявлено, что основная часть сооружений не соответствует биологическим потребностям и физическим возможностям как оседлых, так и периодически мигрирующих рыб.

Рыбопропускные сооружения – ихтиофауна – малые гидроэлектростанции – р. Дебед

The paper presents the ichthyofauna of separate rivers and their tributaries that belong to Debed river basin. It also describes the fish ladder situated in water hubs of Small Hydropower Plants built on those rivers. It has been found that the majority of the above mentioned fish ladders do not meet the biological needs and physical capabilities of both resident and migratory fish species of those rivers.

Fish ladders – ichthyofauna – small Hydropower Plants – river Debed

Վերջին շրջանում կատարված ուսումնասիրությունների արդյունքում պարզվել է, որ Աղստև և Հախում գետերի ու նրանց որոշ վտակների վրա կառուցված փոքր հիդրոէլեկտրակայանների (ՓՀԷԿ) գործունեության հետևանքով առաջ են եկել մի շարք խնդիրներ, որոնք բացասաբար են ազդում այդ գետերի ձկնաշխարհի կենսաբանականության վրա [3]: Ենթադրելով, որ նման իրավիճակ կարող է լինել նաև Հայաստանի մյուս գետերի վրա կառուցված ՓՀԷԿ-երում, մենք մեր առջև խնդիր ենք

դրել նկարագրել Հայաստանի տարածքով հոսող Դեբեդ գետի և Նրա ավազանին պատկանող առանձին գետերի վրա կառուցված ՓՅԷԿ-երի ձկնուղիները ու ձկնապաշտպան այլ կառույցները և վերլուծել դրանց նշանակությունը վերոնշյալ գետերում բնակվող ձկնատեսակների բնականոն կենսագործունեությունն ապահովելու համար, ինչն էլ հանդիսանում է սույն աշխատանքի նպատակը:

Նյութ և մեթոդ: Ուսումնասիրման համար Նյութ են ծառայել մեր կողմից 1998-2015 թթ. ընթացքում Դեբեդ գետի ու Նրա ավազանին պատկանող վտակների ձկնաշխարհի կազմի ուսումնասիրությունները, որոնց ընթացքում 1.5 մ բռնակ և 0.5 մ տրամագիծ ունեցող ձեռքի ձկնորսական ցանցի, 0.8 մ տրամագիծ ունեցող վերիան ցանցի և ձկնորսական կարթերի օգնությամբ որսվել են 18 ձկնատեսակի պատկանող 974 առանձնյակ: Ձկների որսի, դրանց մշակման և տեսակային որոշումների ընթացքում պահպանվել են ձկնաբանության մեջ ընդունված մեթոդները [4, 5]: Բացի վերոգրյալից, 2015 թ. մայիս-օգոստոսի ընթացքում մոնիթորինգային դիտարկումներ են իրականացվել Ձորագետ գետի ու Նրա առանձին վտակների վրա կառուցված «Ձորագետ-5», «Ձորագետ-6», «Կաթնառատ», «ՁորաՅԷԿ», «Կուրթան», Մարց գետի վրա կառուցված «Պոզիտրոն», Փամբակ գետի և Նրա առանձին վտակների վրա կառուցված «Սպիտակ», «Արջուտ-2», «Վահագնի», «Չանախյի» ՓՅԷԿ-երում: Դիտարկումների ընթացքում առանձնակի ուշադրություն է դարձվել ՓՅԷԿ-երի ջրառ հանգույցներում ձկնապաշտպան կառուցվածքների (ձկնուղի, ձկնապաշտպան ցանց) առկայությանը և գնահատվել է դրանց համապատասխանությունը երաշխավորված չափանիշներին ու տվյալ գետում բնակվող ձկնատեսակների ֆիզիկական և կենսաբանական պահանջմունքներին [1, 2, 4]:

Արդյունքներ և քննարկում: Դեբեդ գետի և Նրա ավազանին պատկանող գետերն ընդհանուր առմամբ հարուստ չեն ձկնատեսակներով: Համաձայն նախկինում կատարված ուսումնասիրությունների, այստեղ է հանդիպում Հայաստանի ջրակալներում գրանցված շուրջ 40 ձկնատեսակներից 18-ը [3, 4]: Էլ ավելի քիչ ձկնատեսակներ են հանդիպում բարձրադիր վայրերով հոսող գետերում, որոնց վրա կառուցված են ՓՅԷԿ-երի մեծ մասի ջրառի գլխամասային կառույցները: Այսպես, Ձորագետի վերին հոսանքում, որտեղ կառուցված է «Ձորագետ-5» ՓՅԷԿ-ի ջրառ հանգույցը (կոորդինատները՝ 44°7'46.24"E-41°1'45.79"N, ծովի մակարդակից բարձրությունը՝ 1738 մ, ճշշումային խողովակաշարի երկարությունը՝ 1850 մ), ձկնատեսակներից ներկայումս հավաստիորեն հանդիպում է կարմրախայտը *Salmo trutta fario* L., 1758: ՓՅԷԿ-ի գլխամասում առկա է բետոնից կառուցված աստիճանաձև ձկնուղի՝ 12.1 մ երկարությամբ և 0.83 մ լայնությամբ: Առկա է բետոնե միջնորմներով իրարից տարանջատված 6 աստիճան, որոնց յուրաքանչյուրի բարձրությունը մոտ 1.30 մ է: Յուրաքանչյուր միջնորմ ունի երկու, իրարից տարբեր բարձրության վրա բացված ճեղքեր՝ յուրաքանչյուրը 0.3X0.3 մ չափերով: Առկա է 3.7 մ երկարությամբ աղբորսիչ ճաղավանդակ, որի ճաղերի միջև հեռավորությունը 3.0-3.5 սմ է: Ճաղերի միջև նման հեռավորություն ունեցող ճաղավանդակը չի կարող արգելել մինչև 15 սմ երկարությամբ ձկների հայտնվելը ճաղերի մյուս կողմում գտնվող ճշշումային խողովակաշարի մեջ: Հարկ է նշել, որ «Ձորագետ-5» ՓՅԷԿ-ի գլխամասի ձկնուղուց դեպի ներքև մոտ 20 մ հեռավորության վրա առկա է ևս մեկ բետոնե պատվար շուրջ 2.0 մ բարձրությամբ, որտեղ բացակայում է ձկնուղին, ինչն անհնար է դարձնում գետում բնակվող ձկների մեծ մասի բնականոն տեղաշարժը դեպի կառուցված ձկնուղի: Ջրառի վայրում նման կառույցի, ինչպես նաև ՓՅԷԿ-ի գլխամասից մի քանի կմ գետի հոսանքն ի վար կառուցված այլ հիդրոտեխնիկական կառույցների առկայությունը (մոտ 3 մ բարձրությամբ բետոնե պատվար և խմելու ջրի խողովակատարեր) թույլ չի տալիս գետի տվյալ հոսանքում պայմաններ ստեղծել Ձորագետի միջին հոսանքում բնակվող Կուրի բեղավանդակ *Barbus cyri* De Filippi, 1865, արևելյան տառեխիկի *Alburnoides eichwaldii* (De Filippi, 1863), կողակի *Capoeta* sp., բառթակի *Gobio* sp. և այլ ձկնատեսակների գետի վերին հոսանքներ բնականոն ներթափանցման և բնակեցման համար: Նման իրավիճակ է նաև Ձորագետ գետի այն հատվածում, որտեղ կառուցված է «Ձորագետ-6» ՓՅԷԿ-ի ջրառ հանգույցը (կոորդինատները՝ 44°8'46.81"E-41°2'21.54"N, ծովի մակարդակից բարձրությունը՝ 1664 մ, ճշշումային խողովակաշարի երկարությունը՝ 2360 մ): Այստեղ ևս հանդիպում է կարմրախայտը, իսկ մնացած ձկնատեսակները չեն կարողանում բնակեցնել այդ տեղանքը վերոգրյալ հիդրոտեխնիկական կառույցների պատճառով: Այս ՓՅԷԿ-ի գլխամասում տեղադրված է 12.2 մ երկարությամբ, 0.67-0.70 մ լայնությամբ բետոնից կառուցված աստիճանաձև ձկնուղի, որի 8 աստիճաններից յուրաքանչյուրի

բարձրությունը մեկը մյուսի նկատմամբ մոտ 0.35 մ է, բացառությամբ առաջին աստիճանի, որն ինքնուրույն, ձկնուղու հիմնական մասից առանձնացված բաղադրամաս է և ավելի բարձր է, քան մյուսները: Առկա է 2.25 մ երկարությամբ աղբորսիչ ճաղավանդակ, որի ճեղքերի միջև հեռավորությունը 2.5 սմ է: Ճաղերի միջև նման հեռավորություն ունեցող ցանցը չի կարող արգելել մոտ 8-10 սմ երկարությամբ մանրաձկների հայտնվելը ճնշումային խողովակատարի մեջ: Հարկ է նշել, որ այս ՓՀԷԿ-ում ձկնուղու առկայությունն էական դեր չի խաղում ձկների տեղաշարժն ապահովելու համար, քանի որ մինչև ջրառի կետ՝ մոտ 50 մ հեռավորության վրա գետի հոսանքը երկատվում է: Արդյունքում ջրի մի մասը հոսում է դեպի ջրառ, իսկ մյուս մասը շարունակում է հոսել գետի բնական հունով, ինչն արդեն իսկ բավական է ձկների բնականոն տեղաշարժը հոսանքն ի վեր ու վար ապահովելու համար:

«Կաթնառատ» ՓՀԷԿ-ի ջրառ հանգույցը (կոորդինատները՝ 44°10'16.48"E–41°2'39.63"N, ծովի մակարդակից բարձրությունը՝ 1608 մ, ճնշումային խողովակաշարի երկարությունը՝ 3800 մ) նույնպես գտնվում է Ձորագետի վերին հոսանքում՝ Նախորդ՝ «Ձորագետ-6» ՓՀԷԿ-ի ջրթողի հարևանությամբ: Այստեղ առկա է 10.28 մ երկարությամբ և 0.85-0.90 մ լայնությամբ բետոնե աստիճանաձև ձկնուղի: Առկա է բետոնե միջնորմներով իրարից տարանջատված 6 աստիճան, որոնցից յուրաքանչյուրի բարձրությունը տատանվում էր 1.20-1.30 մ սահմաններում: Յուրաքանչյուր միջնորմ ունի 0.18-0.20X0.18-0.20 մ չափերով ճեղքեր, որոնք շախմատաձև դասավորված են մեկը մյուսի նկատմամբ: Ձկնուղուց դեպի ներքև, մոտ 20-25 մ հեռավորության վրա առկա է ևս մեկ պատվար 1.5-2 մ բարձրությամբ, որտեղ բացակայում է ձկնուղին, ինչը համարյա անհնար է դարձնում մանր ձկնատեսակների բնականոն տեղաշարժը դեպի կառուցված ձկնուղի: Ջրառի վայրում նման կառույցի առկայությունը չեզոքացնում է ձկնուղու հնարավոր դրական նշանակությունը:

Ձորագետի Գարգառ վտակի միջին հոսանքում, որտեղ կառուցված «Կուրթան» ՓՀԷԿ-ի ջրառ հանգույցը (կոորդինատները՝ 44°33'13.55"E–40°57'30.27"N, ծովի մակարդակից բարձրությունը՝ 1224 մ, ճնշումային խողովակաշարի երկարությունը՝ 3086 մ), հանդիպում են կարմրախայտը, Կուրի բեղաձուկը, արևելյան տառեխիկը: Գլխամասում առկա է աստիճանաձև, 16.2 մ երկարությամբ, 1.0 մ լայնությամբ և 1.80 մ բարձրությամբ բետոնից կառուցված ձկնուղի: Այն կազմված է 7 աստիճանից, որոնցից յուրաքանչյուրն իրարից տարանջատված է բետոնե միջնորմներով: Ձկների տեղաշարժն ապահովելու համար յուրաքանչյուր միջնորմի վրա առկա են տարբեր բարձրության վրա գտնվող երկու՝ 0.35X0.35մ չափեր ունեցող ճեղքեր: Ձկնուղու մեկ միջնորմից մինչև մյուս միջնորմի հեռավորությունը կազմում է 1.95-2.03 մ: Առկա է զուգահեռ դասավորված աղբորսիչ չորս ճաղավանդակ, որոնց ճաղերի միջև հեռավորությունը 2.5-3.5 սմ է, ինչը չի կարող արգելել մինչև 15 սմ երկարությամբ ձկների հայտնվելը ճնշումային խողովակատարում: Ձկնուղուն հարող պատվարի պատճառով Գարգառ գետը գլխամասում առաջացնում է լճականման ջրակալ:

Ի տարբերություն Ձորագետի վրա կառուցված մյուս ՓՀԷԿ-երի, այդ գետի ստորին հոսանքում կառուցված «ՁորաՅԷԿ»-ի ջրառ հանգույցը (կոորդինատները՝ 44°36'33.40"E- 40°57'33.73"N, ծովի մակարդակից բարձրությունը՝ 986 մ, ճնշումային խողովակաշարի երկարությունը՝ 205 մ, ջրատար թունելի երկարությունը՝ 2450 մ) ձկնուղի չունի: Հարկ է նշել, որ «ՁորաՅԷԿ»-ը գործում է 1932 թ.-ից և անցած ողջ տարիների ընթացքում այն իր գլխամասային յուրահատուկ մետաղական կառույցով լիովին կտրել է Դեբեդից դեպի Ձորագետ մտնող ձկների միգրացիոն ճանապարհը՝ օգտագործելով գետի ողջ ջուրն իր թափանիվների աշխատանքն ապահովելու համար: Միաժամանակ գետի վերին հոսանքներում բնակվող ձկները համարյա թե լրիվ զրկված են Դեբեդ թափանցելու հնարավորությունից, իսկ գետի հունը ՓՀԷԿ-ի գլխամասից ներքև համարյա ջրազրկված է և ոչ պիտանի ձկների բնականոն կեսագործունեության համար: ՓՀԷԿ-ի գլխամասում բացակայում է նաև ձկնապաշտպան ցանցը: Դրա փոխարեն առկա են աղբորսիչ ճաղավանդակներ, որոնց ճեղքերի միջև հեռավորությունը 8 և ավելի սմ է: Ճաղերի միջև այդքան տարածություն ունեցող ճաղավանդակը չի կարող արգելել Ձորագետում բնակվող ձկնատեսակների՝ կարմրախայտի, արևելյան տառեխիկի, Կուրի բեղաձկան, կողակի և մյուսների հայտնվելը ՓՀԷԿ-ի տուրքիններ գնացող ճնշումային խողովակաշարում:

Դեբեդի վտակ հանդիսացող Մարց գետի ավազանում, որտեղ կառուցված է «Պո-գիտրոն» ՓԷԿ-ի ջրառ հանգույցը (կոորդինատները՝ 44°42'39.93"E-40°53'48.78"N, ծովի մակարդակից բարձրությունը՝ 1356 մ, ճնշումային խողովակաշարի երկարությունը՝ 3680 մ), կարող են հանդիպել կարմրախայտը, Կուրի բեղաձուկը, արևելյան տառեխիկը: Գլխամասում առկա է աստիճանաձև բետոնե ձկնուղի՝ շուրջ 12.0 մ երկարությամբ և 1,5 մ լայնությամբ: Ձկնուղին բետոնե միջնորմներով բաժանված է 0.8 մ բարձրությամբ 9 հատվածներից, որոնք իրար են միացած ճեղքերով: Առկա է աղբորսիչ, որի ճեղքերի միջև հեռավորությունը 2.0-3.0 սմ է: Ճաղերի միջև այդքան հեռավորություն ունեցող ճաղավանդակը չի կարող արգելել ավելի քան 10 սմ երկարությամբ մանրածկերի հայտնվելը ՓԷԿ-ի տուրքիններ գնացող ճնշումային խողովակաշարում:

Փամբակ գետի այն հատվածում, որտեղ կառուցված է «Սպիտակ» և «Արջուտ 2» ՓԷԿ-երի ջրառ հանգույցները (համապատասխանաբար՝ կոորդինատները՝ 44°17'36.14"E- 40°49'52.19"N և 44°22'22.88"E-40°50'45.29"N, ծովի մակարդակից բարձրու-թյունը՝ 1490 և 1430 մ, ճնշումային խողովակաշարի երկարությունը՝ 2685 և 1880 մ), հանդիպում են կարմրախայտը, Կուրի բեղաձուկը, արևելյան տառեխիկը, կողա-կը: Գետի ջրերով սնվող Ֆերմերային մանր ձկնային տնտեսություններից այստեղ է ներթափանցում նաև ծիածանախայտը: «Սպիտակ» ՓԷԿ-ի ջրառ հանգույցում առկա է 4 աստիճաններով դասավորված մոտ 6.5 մ երկարությամբ և 1.0 մ լայնությամբ բետոնից կառուցված ձկնուղի: Յուրաքանչյուր աստիճան ունի մեկը մյուսի նկատմամբ 30.0-35.0 սմ բարձրություն, զուրկ է ձկների անցման համար նախատեսված ճեղքերից, իսկ վերին աստիճանը ցածր է գետի հունը փակող խողովակից մոտ 60 սմ, ինչը լրացուցիչ դժվարություններ է ստեղծում գաղթող ձկնատեսակների համար: Գլխամասում բացակայում է ձկնապաշտպան ցանցը: Դրա փոխարեն առկա է 6.0 մ երկարություն ունեցող աղբորսիչ 2 ճաղավանդակ, որոնց ճաղերի միջև հե-ռավորությունը 5.0-5.5 սմ է: Ճաղերի միջև նման հեռավորություն ունեցող ճաղավան-դակը չի կարող խոչընդոտել Փամբակում բնակվող ձկների մեծ մասի հայտնվելուն ՓԷԿ-ի ճնշումային խողովակաշարի մեջ:

«Արջուտ 2» ՓԷԿ-ի ջրառ հանգույցում բացակայում է ձկնուղին: Ձկնուղու բա-ցակայությունը և գետի հունի վրա կիսաքանդ պատվարը արգելք են հանդիսանում գետում տարածված ձկնատեսակների սեզոնային գաղթը գետի հոսանքն ի վեր կատարելու համար: Գլխամասում բացակայում է նաև ձկնապաշտպան ցանցը: Դրա փոխարեն առկա է 2 աղբորսիչ՝ համապատասխանաբար 2.9 և 3.9 մ երկարությամբ, որոնց ճեղքերի միջև հեռավորությունը 5.5-6.0 սմ է: Ճաղերի միջև այդքան տա-րածություն ունեցող աղբորսիչը չի կարող խոչընդոտել Փամբակում բնակվող ձկների մեծ մասի հայտնվելուն ՓԷԿ-ի ճնշումային խողովակաշարի մեջ:

Փամբակ գետի վտակ հանդիսացող Տանձուտ գետի այն հատվածում, որտեղ կա-ռուցված է «Վահագնի» ՓԷԿ-ի ջրառ հանգույցը (կոորդինատները՝ 44°31'18.51"E-40°47'34.77"N, ծովի մակարդակից բարձրությունը՝ 1396 մ, ճնշումային խողովակաշարի երկարությունը՝ 16 200 մ), կարող են հանդիպել կարմրախայտը, արևելյան տառեխիկը, Կուրի բեղաձուկը: Ֆերմերային ձկնային տնտեսություններից այստեղ կարող է ներթափանցել նաև ծիածանախայտը, իսկ ջրառ հանգույցից մոտ 1.5 կմ հոսանքն ի վար գտնվող արհեստական լճակից՝ արծաթափայլ կարասը: Ջրառ հանգույցում առկա է 1.20 մ երկարությամբ, 1.03 մ բարձրությամբ և 0.91 մ լայնությամբ բետոնից կառուցված 5 աստիճան, որոնցից յուրաքանչյուրն ունի մոտ 25.0 սմ բարձրություն: Նման կառուցվածքը չի կարող ձկնուղու դեր կատարել Տանձուտ գետում բնակվող ձկնատեսակների համար: Առկա է 6.5 մ երկարությամբ մանր անցքերով աղբորսիչ, որը կարող է նաև ձկնապաշտպան ցանցի դեր կատարել: Յարկ է նշել, որ Տանձուտ գետը՝ հոսելով Վանաձոր քաղաքի միջով, աղտոտվում է կենցաղային աղբով և կոյուղաջրերով, որի ինքնամաքման գործընթացին որոշակիորեն խանգարում է ՓԷԿ-ի կողմից ջուր վերցնելը և մոտ 17 կմ դեպի Վահագնի գյուղ ձգվող խողովակատարի առկայությունը: Գետի հունում ջրի քիչ քանակությունը Վանաձոր քաղաքում և դրա շրջակայքում առաջացնում է հակաամիտարական վիճակ՝ ազդելով նաև ձկների բնականոն կենսագործունեության վրա:

Փամբակ գետի վտակ հանդիսացող Չանախչի գետի այն հատվածում, որտեղ կառուցված է «Չանախչի» ՓԷԿ-ի ջրառ հանգույցը (կոորդինատները՝ 44°39'56.54"E-40°54'31.60"N, ծովի մակարդակից բարձրությունը՝ 1101 մ, ճնշումային խողովակաշա -

րի երկարությունը՝ 1240 մ), հանդիպում են կարմրախայտը, արևելյան տառեխիկը, Կուրի բեղաձուկը, հազվադեպ՝ Սևանի կողակը: Ֆերմերային ձկնային տնտեսություններից այստեղ է ներթափանցում ծիածանախայտը: ՓՅԷԿ-ի ջրառ հանգույցում առկա է 8.1 մ երկարությամբ և 1.1 մ լայնությամբ կիսաբոլոր հատվածքով 6 աստիճանանոց բետոնե կիսաբայթաձև ձկնուղի: Ձկնուղու ստորին մասը ավարտվում է մոտ 1 մ երկարություն ունեցող գլանաձև փրա, ինչը լրացուցիչ դժվարություն է ստեղծում ձկների հոսանքն ի վեր գաղթի համար: Գլխամասում բացակայում է ձկնապաշտպան ցանցը: Դրա փոխարեն առկա է 8.0 մ երկարությամբ երկու աղբորսիչ, որոնց ճաղերի միջև հեռավորությունը 4.0-6.0 սմ է: Ճաղերի միջև այդքան տարածություն ունեցող ճաղավանդակը չի կարող արգելել Չանախչի բնակվող ձկների մեծ մասի հայտնվելը ՓՅԷԿ-ի ճնշումային խողովակատարի մեջ:

Բնապահպանական տեսանկյունից կարևորագույն խնդիրներից մեկն էլ ձկնուղիներով հոսող ջրի ճիշտ քանակի սահմանումն է: Հայտնի է, որ ձկների գաղթային բնագրի արթնացման համար ահրաժեշտ է ջրի հոսքի որոշակի սահմանային քանակ, ինչը հատուկ է յուրաքանչյուր ձկնատեսակի համար [6]: Մեր նախնական դիտարկումների համաձայն՝ մայիս, հունիս ամիսներին ձկնուղիներով հոսող ջրւրը նորմայից ավելի շատ է, և ձկնուղիների մեծ մասում ստեղծվում է ջրի այնպիսի արագ հոսք ու մեծ ճնշում, որոնք հաճախ անհաղթահարելի են հատկապես մանր ձկնատեսակների համար: Միաժամանակ հուլիս և օգոստոս, ինչպես նաև ծմռան ամիսներին, երբ գետի հունի մեջ պակասում է հոսող ջրի քանակը, ձկնուղիներում ջրի քանակը սովորաբար նվազում է այնքան, որ չի կարող նպաստել ձկների մոտ գաղթի բնագրն արթնալուն: Արդյունքում, մեր կողմից ուսումնասիրված գետերի վրա կառուցված ձկնուղիներով հոսող ջրի քանակը հաճախ չի նպաստում ձկների ազատ տեղաշարժին և ձկնային պաշարների պահպանմանն ու վերականգնմանը:

Այսպիսով, Դեքեր գետի և նրա վտակների հունների վրա կառուցված ՓՅԷԿ-երի ձկնուղիների տեսակների և կառուցվածքային լուծումների վերլուծությունը ցույց է տալիս, որ ձկնուղիների էական մասը չի համապատասխանում այդ գետերում բնակվող և պարբերաբար միգրացիաներ կատարող տեղաբնակ ձկնատեսակների կենսական պահանջմունքներին ու ֆիզիկական հնարավորություններին: Այդ իմաստով դրանք մեծամասամբ ինքնանպատակ են ու չեն համապատասխանում նմանատիպ կառույցների նկատմամբ ժամանակակից պահանջներին, ինչն էլ հանդիսանում է դրանց ոչ լիարժեք գործելու հիմնական պատճառը: Մյուս կողմից, ՀՀ-ում ձկնուղիները նախագծվում են գործող նորմերի համաձայն, ինչն իրականում մշակված է հարթավայրային մեծ գետերի համար [2, 6]: Հայաստանի գետերում բնակվող ձկնատեսակների զգալի մասը չի կարողանում հաղթահարել ՓՅԷԿ-երի կառուցման արդյունքում ստեղծված արգելքները՝ բետոնե պատվարները, իսկ ձկնուղի կառուցվածքները չեն ապահովում իրենց վրա դրված հիմնական նպատակը՝ կամուրջ հանդիսանալ գետի տարբեր հատվածներում բնակվող ձկնատեսակների ազատ տեղաշարժի և ձկնային պաշարների պահպանմանն ու բնականոն վերարտադրման համար:

Սույն աշխատանքը կատարվել է «Աջակցություն փոքր ՀԷԿ-երին վերաբերող բարեփոխումներին՝ գետային էկոհամակարգերի կայուն օգտագործման նպատակով հանրության և ՀՀ բնապահպանության նախարարության երկխոսության միջոցով» ծրագրի շրջանակներում՝ ՄԱԶԾ-ԳԷՀ Փոքր դրամաշնորհների ծրագրի աջակցությամբ:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. Սամվելյան Ա.Լ. Փոքր հիդրոէլեկտրակայանների ձկնուղի կառուցվածքների ինժեներական ապահովումը լեռնային պայմաններում: Սեղմագիր տեխնիկական գիտ. թեկն. գիտ. աստ. հայցման համար ատենախոսության, Երևան, 22 էջ, 2015:
2. Սամվելյան Ա.Լ., Գաբայան Գ.Ս., Պիպոյան Ս.Խ. Ձկնատեսակների մարմնի չափերը որպես ձկնուղի կառուցվածքի չափերը որոշող գործոն. Ճարտարապետության և շինարարության Հայաստանի ազգային համալսարանի տեղեկագիր, 44, 6, էջ 31-38, 2014:
3. Պիպոյան Ս.Խ., Առաքելյան Ա.Ս., Գալստյան Լ.Գ., Գաբայան Ի.Ս. Աղստև և Հախում գետերի փոքր հիդրոէլեկտրակայանների ձկնուղիները և դրանց նշանակությունը ձկնաշխարհի պահպանության համար. Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 68, 1, էջ 75-78, 2016:

4. *Левин Б.А., Рубенян А.Р.* О новых ихтиологических находках в Армении. Российский журнал биологических инвазий. 1, с. 39-45, 2012.
5. *Пипоян С.Х.* Ихтиофауна Армении: этапы формирования и современное состояние. ISBN 978-3-8473-9977-3, с. 548, 2012.
6. *Правдин И.Ф.* Руководство по изучению рыб. М.: Пищ. пром-сть, 376 с., 1966.
7. Строительные нормы и правила. Подпорные стены, судоходные шлюзы, рыбопропускные и рыбозащитные сооружения: СНиП 2.06.07-87. М., 51 с., 1989.
8. Редкие и исчезающие животные. Рыбы: Справ. пособие. Павлов Д.С., Савваитова К.А., Соколов Л.И., Алексеев С.С.; под ред. В.Е. Соколова. М., Высш. шк., 334 с., 1994.

Ստացվել է 18.09.2015



Биол. журн. Армении, 2 (68), 2016

ОБЕЗЗАРАЖИВАЮЩИЕ СВОЙСТВА НАНОКОМПОЗИТНОГО ФИЛЬТРА НА ОСНОВЕ ПОРИСТОГО МИНЕРАЛА ТУФА И НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ФИЛЬТРАЦИИ БОЛЬШИХ ОБЪЕМОВ ВОДЫ

Н.С. МНАЦАКАНЯН¹, А.А. ТРЧУНЯН²

¹“ТОНУС-ЛЕС” ООО “ЭФДИЭЙ ЛАБ” испытательная лаборатория

²ЕГУ, кафедра микробиологии и биотехнологии растений и микроорганизмов
narine.mnatsakanyan@fdalab.am

В матрицу бытового фильтра, состоящего из пористого минерала туфа и изготовленного в соответствии с техническим регламентом (ТУ РА 23477755.1918-99), путем химического осаждения встраивали наночастицы Ag. В результате были получены нанокompозитные фильтры, которые обладают высокой биологической активностью. Изучено их бактерицидное действие на микроорганизмы, содержащиеся в воде. Эти фильтры можно использовать для обеззараживания воды.

*Бытовой фильтр – нанокompозит – наночастицы Ag – фильтрация воды –
антимикробная активность*

Շակրտկեն հանքային տուֆից կազմված կենցաղային գտիչի մատրիցայի մեջ, որն արտադրվում է համաձայն ՀՀ ՏՀ 23477755.1918-99 տեխնիկական կանոնակարգի, քիմիական նստեցմամբ ներկառուցվել են Ag նանոմասնիկներ: Արդյունքում ստացվել են նանոկոմպոզիտ գտիչներ, որոնք օժտված են բարձր կենսաբանական ակտիվությամբ: Ուսումնասիրվել է դրանց բակտերիցիդ ազդեցությունը ջրում պարունակվող միկրոօրգանիզմների վրա: Այդ գտիչները կարելի է օգտագործել ջրերի ախտահանման համար:

Կենցաղային գտիչ – նանոկոմպոզիտ – Ag նանոմասնիկներ – ջրի զտում – հակամանրէային ակտիվություն

By chemical deposition Ag nanoparticles were inserted into the matrix of household filter, consisting of tuff porous mineral and manufactured in accordance with the technical regulations (TC RA 23477755.1918-99). As a result, a nanocomposite filters that have a high biological activity were obtained. Their bactericidal activity against microorganisms contained in the water was studied. These filters can be used for the water disinfection.

Household filter – nanocomposite – Ag nanoparticles – water filtration – antimicrobial activity

Загрязнение вод, в том числе питьевой воды, представляет серьезную экологическую проблему. Из-за загрязнения питьевой воды в первую очередь страдает здоровье человека. По оценкам ВОЗ ежегодно среди детей в возрасте до пяти лет регистрируется 2.5 млрд. случаев диареи и это заболевание становится причиной смерти 1.5 млн. детей.

88 % случаев диареи связано с непригодной для питья водой, с несоблюдением требований гигиены [1]. Проблема фильтрации и обеззараживания воды, используемой человеком, остается актуальной. Сейчас выпускается множество бытовых фильтров, отличающихся друг от друга по степени очистки, методу фильтрации и удобству применения. По методу очистки различают следующие категории фильтров: механические, ионно-обменные, системы обратного осмоса, физико-химические, электрические [2,10]. Большинство фильтров осуществляют очистку лишь определенного спектра загрязнений, поэтому для достижения более эффективных результатов используют комбинацию нескольких фильтров, различающихся способом фильтрации, или конструируют системы фильтрации, которые требуют значительных затрат при установке и последующей эксплуатации. Однако существенным недостатком большинства фильтров, осуществляющих очистку вод вышеперечисленными способами, является то, что при нерегулярной подаче воды в них самих могут накапливаться и размножаться микроорганизмы, так как в фильтрах создаются благоприятные условия для их развития, в результате чего сами фильтры становятся источником заражения воды.

Проведены исследования, направленные на усовершенствование фильтрующего картриджа, которое осуществляло бы сразу несколько методов обработки воды, в частности обеззараживание. Для этого использовался фильтрующий картридж, изготовленный из экологически чистого природного пористого минерала туфа (Ервандакертское месторождение, Армения) в соответствии с техническим регламентом [3]. Фильтр имеет упорядоченно структурированную пористость с размерами пор до 1 мкм, т.е. осуществляет механическую фильтрацию. Вместе с тем, туф является минералом, имеющим высокие сорбционные свойства, в результате чего фильтрация осуществляется также за счет сорбции вредных веществ, растворенных в воде.

Картриджи имеют гигиенический сертификат Министерства здравоохранения РА (№72 от 22.09.99 г.) и получили санитарно-эпидемиологическое заключение Российской Федерации (№77.99.10.234.Д.004597.06.04 от 03.06.2004 г.). Имеется заключение о возможности применения фильтра из природных пород в практике хозяйственно-питьевого водоснабжения для доочистки питьевой воды из артезианских скважин от повышенной мутности, цветности и железа. Однако эти фильтры не осуществляют микробиологическую очистку. Бактерицидные свойства Ag и его соединений известны с давних времен [7, 16]. Показано подавляющее действие Ag на бактерии, причем оно сильнее, чем действие других металлов [12,19]. Добавление к фильтру наночастиц Ag может привести к получению нанокомпозитного фильтра, который вместе с вышеперечисленными фильтрующими свойствами будет обладать ещё и бактерицидными свойствами.

Целью настоящей работы являлось выявление наличия антимикробной активности нанокомпозитного фильтра (сочетание туф/Ag), изучение антимикробной активности фильтра по отношению к смешанной культуре микроорганизмов, а также изучение его фильтрующего ресурса при фильтрации больших объемов сильно загрязненной воды.

Материал и методика. Фильтры и их получение. На первой стадии приготовления фильтра осуществляется дробление минерала туфа на гранулы разных размеров. Из строго определенных фракций гранул в определенном соотношении готовится смесь. На этой стадии приготовления к смеси добавляются наночастицы Ag, полученные электролитическим методом [11]. Далее этой смеси придается цилиндрическая форма, после чего она подвергается термической обработке, в процессе которого происходит скрепление гранул друг с другом, встраивание и фиксирование наночастиц Ag в структуру природного минерала (рис.1).

Размер пор по мере продвижения к центру фильтрующего элемента уменьшается. В процессе фильтрации вода снаружи направляется внутрь.

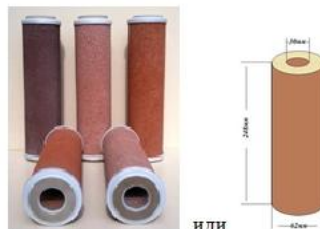


Рис. 1. Фильтр, изготовленный из туфа (справа).

Антимикробное действие нанокompозитного фильтра. Для выявления наличия бактерицидных свойств нанокompозитного фильтра был использован диск-диффузионный метод [9] в некоторой модификации. Для этого поверхность питательной среды в чашках Петри была засеяна суспензией тест-микроба *Escherichia coli* ATCC 25922 (American Type Culture Collection), которая была приготовлена из суточной культуры. Для получения газона использовали суспензию бактерий с концентрацией 10^6 КОЕ/мл. К среде добавляли такое количество суспензии клеток, которое обеспечило бы оптимальный рост тест-микроба и четкость зон угнетения его роста. Сразу же после посева на пластинку агара были положены кусочки нанокompозитного фильтра и кусочки фильтра без Ag, смоченные стерильной дистиллированной водой. Чашки инкубировали при температуре 37°C в течение 24 ч.

Изучение обеззараживающих свойств фильтра по отношению к смешанной культуре микроорганизмов. Для изучения антимикробного действия Ag по отношению к высокой концентрации смешанной культуры микроорганизмов, а также для изучения фильтрующего ресурса нанокompозитного фильтра, соорудили конструкцию (рис.2), которая позволила бы осуществить фильтрацию больших объемов воды с большой микробиологической нагрузкой.

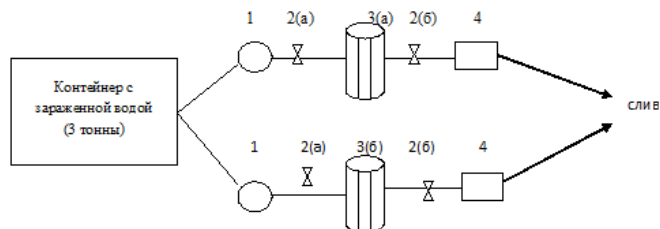


Рис. 2 Схема конструкции по фильтрации воды: 1-счётчик воды, 2-пробоотборники: 2(а)-до фильтрации, 2(б)-после фильтрации, 3- колбы с фильтрующими картриджами: 3(а)-фильтрующий картридж без Ag, 3(б)-фильтрующий картридж с Ag, 4-вакуумный насос.

Для этого контейнер вместимостью в 3 т заполняли водой, загрязненной микроорганизмами (100 г почвы). На выходе контейнера смонтировали две разоб-щенные трубы, на каждой из которых установили фильтрующие колбы с одинаковыми фильтрующими картриджами, одна из которых содержит наночастицы Ag, другая не содержит Ag. Перед каждым фильтром смонтировали счетчик для прос-слеживания профильтрованных объемов воды. До и после фильтрующей колбы ус-тановили пробоотборники.

Загрязненную воду одновременно прокачивали через оба фильтра: с Ag и без Ag. Отбирали пробы воды до и после фильтрации 100 л, 500 л и 1000 л воды.

По 1 мл с каждой пробы глубинно сеяли в питательную среду (Nutrient agar/Liofilchem). Все чашки инкубировали при температуре 37°C в течение 24-48 ч. После инкубации подсчитывали количество колонийобразующих единиц (КОЕ), вычисляли среднее значение и на основе этих данных рассчитывали пропуск-каемость и бактерицидный эффект фильтра с Ag и без Ag в процентах (табл.1).

Результаты и обсуждение. После инкубации агаровой пластины с кусочками фильтров осуществили визуальную оценку. Вокруг кусков фильтра с Ag четко виднелись 2-4-миллиметровые зоны задержки роста тест-микроба, (которая осталась неизменной даже после 7 дней инкубации), что свидетельствует о наличии бактерицидных свойств фильтра (рис.3), а куски фильтра без Ag не вызывали задержку роста тест-микроба.

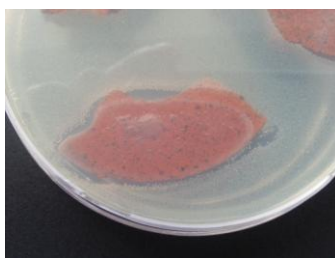


Рис. 3 Кусок нанокompозитного фильтра с Ag на газоне *E. coli* ATCC 25922 в чашке Петри с питательной средой. Вокруг и под куском нанокompозитного фильтра с Ag видна зона задержки роста тест культуры.

После фильтрации 100 л воды с микробиологической нагрузкой в среднем 3940 КОЕ/мл бактерицидный эффект фильтра без Ag составил в среднем $12,94\% \pm 0,21\%$, а с Ag составил в среднем $53,30\% \pm 4,78\%$ (рис. 4). После фильтрации 500 л воды со средней микробиологической нагрузкой 3720 КОЕ/мл бактерицидный эффект фильтра без Ag составил в среднем $9,68\% \pm 3,06\%$, а с Ag – $44,35\% \pm 4,17\%$. Наконец, после фильтрации 1000 л воды со средней микробиологической нагрузкой 4300 КОЕ/мл бактерицидный эффект фильтра без Ag составил в среднем $15,58\% \pm 2,85\%$, а с Ag – $47,91\% \pm 0,61\%$ (рис. 4). Получается, что после фильтрации 1000 л сильно загрязненной воды с микробиологической нагрузкой в среднем 3987 КОЕ/мл бактерицидный эффект фильтра без Ag составил в среднем $12,73\% \pm 2,04\%$, а бактерицидный эффект фильтра с Ag составил в среднем $48,52\% \pm 3,19\%$. Из полученных результатов видно, что бактерицидный эффект фильтра с Ag от 3,0 до 4,5 раза превышает бактерицидный эффект фильтра без Ag, что вызвано токсичным воздействием Ag на микроорганизмы. Однако при сравнении антимикробной активности обоих фильтров с Ag и без Ag видно наличие слабой антимикробной активности фильтра без Ag, что обусловлено структурой фильтра (размеры пор до 1 мкм) и свойствами минерала туфа (сорбционные свойства).

По мере увеличения объемов фильтруемой воды антимикробная активность фильтра без Ag незначительно увеличивается, что носит кратковременный характер, так как это вызвано тем, что поры фильтра в процессе фильтрации засоряются, то есть его пропускная способность уменьшается, и сравнительно крупные микроорганизмы задерживаются в порах фильтра, что в конце приведет к закупориванию фильтра и ее непригодности. В отличие от этого, антимикробная активность нанокompозитного фильтра обусловлена бактерицидными свойствами наночастиц Ag.

Таблица 1. Подсчёт колоний, выросших в питательной среде при посеве воды, до и после фильтрации разных объемов зараженной смешанной культурой воды через фильтр без Ag и содержащий Ag.

Количество профильтрованной воды, л	Количество КОЕ/мл до фильтрации	Количество КОЕ/мл после фильтрации	
		фильтр без Ag	фильтр с Ag
100	3940	3430	1840
Пропускаемость, %	100	87,05	46,70
500	3720	3360	2070
Пропускаемость, %	100	90,32	55,65
1000	4300	3630	2240
Пропускаемость %	100	84,42	52,09

На бактерицидный эффект нанокompозитного фильтра с Ag косвенным образом влияет общая и органическая загрязненность фильтруемой воды: так при большой органической загрязненности пропускающая способность фильтра уменьшается, тем самым уменьшается площадь соприкосновения воды с фильтрующим материалом, содержащим наночастицы Ag.

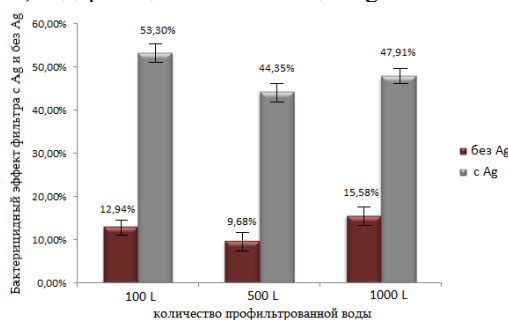


Рис. 4. Бактерицидный эффект фильтра без Ag и с Ag по отношению к смешанной культуре микроорганизмов после фильтрации 100 л, 500 л и 1000 л воды.

Было доказано, что наночастицы Ag сами по себе менее токсичны для бактерий, чем ионы, высвобождаемые при окислении наночастиц Ag [7, 20].

Позднее работами других исследователей было доказано, что при бактерицидном эффекте степень активности серебра тем больше, чем выше концентрация ионов серебра [13]. Степень антимикробной активности наночастиц Ag зависит также от их формы, размеров, разряженности [4, 8, 14, 18]. Антимикробная активность ионов Ag может быть увеличена во много раз в присутствии карбонатов, растворенных в воде [17]. Доказано также наличие бактерицидного эффекта Ag, включенного в состав различных матриц, чем расширяется спектр его применения [5, 15].

Существует множество теорий, объясняющих механизм действия Ag на микроорганизмы, согласно которым положительно заряженные ионы Ag адсорбируются клетками бактерий, имеющих отрицательный заряд, после чего проникают внутрь клетки и ингибируют ферменты дыхательной цепи, а также разобщают процессы окисления и окислительного фосфорилирования, в результате чего клетка гибнет [6, 19].

Таким образом, выявлена возможность придания антимикробной активности минералу туф, что открывает перспективы для получения материалов с антимикробными свойствами на основе других минералов и Ag, которые смогут найти практическое применение. Полученный нанокompозитный фильтр, состоящий из

пористого минерала туфа со встроенными наночастицами Ag, наряду с механическими и сорбционными, имеет также бактерицидные свойства, которые сохраняются до истощения его механических свойств. Антимикробная активность фильтра предотвращает также возможность развития микроорганизмов в самом фильтрующем картридже. Он может быть использован и для обеззараживания воды.

ЛИТЕРАТУРА

1. Глобальная ежегодная оценка состояния санитарии и водоснабжения в рамках механизма ООН по водным ресурсам. ГЛААС 2010. Всемирная организация здравоохранения, Женева, 2011.
2. *Зинна Н.* Методы фильтрации воды в системах водоподготовки. "Сантехника" №4, 2005.
3. Технические условия ТУ РА 23477755.1918-99. Фильтр бытовой для питьевой воды из природных пород.
4. *Abbaszadegan A., Ghahramani Y., Gholami A., Hemmateenejad B., Dorostkar S., Nabavizadeh M., Sharghi H.* The Effect of Charge at the Surface of Silver Nanoparticles on Antimicrobial Activity against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria: A Preliminary Study. *Journal of Nanomaterials*, Article ID720654, 8pages, 2015.
5. *Azócar I., Vargas E., Duran N., Arrieta A., González E., Pavez J., Kogand M.J., Zagal J.H., Paez M.A.* Preparation and antibacterial properties of hybrid-zirconia films with silver nanoparticles. *Materials Chemistry and Physics*, 137, p.396-403, 2012.
6. *Chen M., Yang Z., Wu H., Pan X., Xie X., Wu C.* Antimicrobial activity and the mechanism of silver nanoparticle thermosensitive gel. *Int J Nanomedicine* 6, p.2873-7, 2011.
7. *Choi O., Deng K.K., Kim N.J., Ross L.Jr., Surampalli R.Y., Hu Z.* The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Res.*, 42, 12, p.3066-74, 2008.
8. *Chun-Nam Lok, Chi-Ming Ho, Rong Chen, Qing-Yu He, Wing-Yiu Yu, Hongzhe Sun, Jen-Fu Chiu, Chi-Ming Che.* Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 12, p.527-534, 2007.
9. EUCAST European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Disk diffusion method. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Version 5.0, 2015.
10. Household water treatment and safe storage: manual for the participant. World Health Organization. Western Pacific region, 2013.
11. *Iravani S., Korbekandi H., Mirmohammadi S.V., Zolfaghari B.* Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. *Res Pharm Sci.* 9, 6, p.385-406, 2014.
12. *Jung W.K., Koo H.C., Kim K.W., Shin S., Kim S.H., Park Y.H.* Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 7, p.2171-2178, 2008.
13. *Kim J.S., Kuk E., Yu K.N., Kim J.H., Park S.J., et al.* Antibacterial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biol. Med.*, 3, p.95-100, 2007.
14. *Pal S., Tak Y.K., Song J.M.* Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 6, p.1712-1720, 2007.
15. *Palza H.* Antimicrobial Polymers with Metal Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, p.2099-2116, 2015.
16. *Prabhu S., Poulose E.K.* Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International Nano Letters*, 2, 32, 2012.
17. *Swathy J.R., Udhaya M.S., Amrita C., Sahaja A., Pradeep T.* Antimicrobial silver: An unprecedented anion effect. *Scientific reports*, 4, p.7161, 2014.

18. *Swathy J.R., Udhaya M.S., Amrita C., Sahaja A., Pradeep T.* Antimicrobial silver: An unprecedented anion effect. *Scientific reports*, 4, p.7161, 2014.
19. *Umadevi M., Rani T., Balakrishnan T., Ramanibai R.* Antimicrobial activity of silver nanoparticles prepared under at ultrasonic field. *International journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*, 4, 3, 2011.
20. *Vardanyan Z., Gevorkyan V., Ananyan M., Vardapetyan H., Trchounian A.* Effects of various heavy metal nanoparticles on *Enterococcus hirae* and *Escherichia coli* growth and proton-coupled membrane transport. *J Nanobiotechnology*, 13, 69, 2015.
21. *Xiu Z., Zhang Q., Puppala H.L., Colvin V.L., Alvarez P.J.* Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles. *Nano Lett.*, 12, p.4271-4275, 2012.

Поступила 12.01.2016



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 2(68), 2016

ԱՆՍՈՌՈՒԿ ԴԱՇՏԱՅԻՆԻ / MYOSOTIS ARVENSIS (L.) HILL/ ԲՆՈՒԹԱԳԻՐԸ, ՏԱՐԱԾՎԱԾՈՒԹՅՈՒՆԸ, ԱԳՐՈՏԵԽՆԻԿԱՆ ԵՎ ԱՐՏԱԴՐՈՒԹՅՈՒՆՈՒՄ ՆԵՐՂՆԵԼՈՒ ՀՆԱՐԱՎՈՐՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

Մ.Ս. ԾԱՏՐՅԱՆ

Արցախի պետհամալսարան, կենսաբանության ամբիոն,
maya.c@mail.ru

Ուսումնասիրվել են սննդային, համեմունքային և բուժական նշանակություն ունեցող խոտաբույսի՝ անմոռուկ դաշտայինի (*Myosotis arvensis* (L.) Hill) բազմացման, աճի ու զարգացման առանձնահատկությունները, մշակությունը և տարածվածությունը: Մշակվել է բույսի ագրոտեխնիկական միջոցառումների համակարգ. ստացվել են բերքի քիմիական վերլուծության արդյունքները և տնտեսական արդյունավետությունը: Կազմվել է անմոռուկի մշակության տեխնոլոգիական քարտը:

Գաղտրիկազգիներ – դեղաբույսեր – արեալ – ցանք – ծլունակություն – վեգետացիոն շրջան

Исследовали размножение, рост, особенности развития, выращивание и распространение растения незабудки полевой (*Myosotis arvensis* (L.) Hill). Разработан комплекс агрохимических мероприятий: проведен химический анализ полученного урожая, определена ее экономическая эффективность. Составлена технологическая карта незабудки полевой.

Бурачниковые – лекарственные растения – ареал – посев – всхожесть – вегетационный период

The breeding, growth and development features, cultivation and prevalence of *Myosotis arvensis*, which has nutritional and curative importance have been investigated. The system of agricultural activities as well as the obtained harvest were elaborated, its chemical analysis was conducted and its economic efficiency was defined. As a result of research, the technological card of the *Myosotis arvensis* was drawn up.

Borraginaceae – medicinal plants – areal – sowing – the ability to germinate – vegetation

Անմոռուկ դաշտայինը (*Myosotis arvensis* (L.) Hill) = Անմոռուկ տարատիկ (*Myosotis heteropoda* Trautv.) գաղտրիկազգիների (Borraginaceae) ընտանիքին պատկանող միամյա կամ երկամյա խոտաբույս է: Յողունը ուղղաձիգ է և ճյուղավորվող, 10-50 սմ բարձրությամբ, պատված մազմզուկներով: Ճյուղավորումը կարող է լինել հիմքից կամ ցողունի միջին մասից: Արմատը կարճ է, իսկ արմատային համակարգը՝ առանցքային: Բույսն ունի հերթադիր տերևադասավորություն, տերևները երկարավուն - նշտարաձև են, երկու կողմից՝ ծածկված մազմզուկներով [6, 7]:

Անմոռուկի ծաղիկները փոքր խմբերով են՝ տեղադրված միմյանց մոտ, ծաղիկները փոքր չափեր ունեն. 2-5 մմ տրամագծով, երկնագույն, հազվադեպ՝ վարդագույն կամ սպիտակ, դեղին աչիկներով և հավաքված ոլորք ծաղկաբույլերում: Ծաղկում է մայիսի վերջերից մինչև հունիսի կեսերը (երբեմն մինչև սեպտեմբեր, հոկտեմբեր): Պտուղը ընկուզիկ է: Այն ունի մուգ գունավորում /սև կամ մուգ շագանակագույն/: Պտուղը քառահատիկանի է, հատիկները խոշոր են, ձվաձև, փոքր-ինչ ճզմված [1, 3]:

Հունիսից սկսվում է սերմառաջացումը: Մեկ բույսի վրա առաջանում է 700 սերմ: Մեկ գ պտուղը պարունակում է 1500-2000 սերմեր: Սերմերի ծլունակությունը պահպանվում է 2-3 տարի [5, 9]: Մեղրատու և դեղատու բույս է: Դեղագործական նպատակով օգտագործում են բույսի վերգետնյա մասը: Բույսն օժտված է հակաբորբոքային, խորխաբեր, արյունահոսությունը կանգնեցնող հատկություններով [1, 4]: Որպես դեղամիջոց անմոռուկն օգտագործել են դեռ հնագույն ժամանակներից, այդ մասին է վկայում Ավիցենան: Շատ ազգեր բույսը համարում են հավատարմության և կայունության խորհրդանիշ [2, 4, 10]: Անմոռուկը տարածված է Լեռնային Ղարաբաղի հանրապետության բոլոր շրջաններում՝ Մարտակերտ, Ասկերան, Մարտունի, Շուշի, Հադրութ, Զաչաթաղ, Զարվաճառ, ընդգրկելով կիսաանապատային, հետանտառային, անտառային գոտիները, մասնավորապես՝ 500-1500 մ բարձրություններում՝ հետանտառային և անտառային գոտու ստորին զանգվածները: Անմոռուկ դաշտայինը նախընտրում է արևային խոնավ վայրերը: Հանդիպում է ճահճային մարգագետիններում, սորուն տեղերում, ճամփեզրերին, դաշտերում, գետափնյա տեղանքներում, այգիներում:

Ելույթ և մեթոդ: Բույսի սերմնանյութը հավաքվել է արշավախմբային հետազոտական աշխատանքների ընթացքում, սակայն փորձարկման են ենթարկվել Ասկերանի շրջանի հնապատ գյուղի շրջակայքից հավաքված սերմերը, որպես Էյոտիպ: Որոշվել է սերմերի ծլունակությունը:

Ֆենոլոգիական դիտումները կատարվել են ընդունված մեթոդով յուրաքանչյուր 2-3 օրը մեկ անգամ: Բույսի աճի, զարգացման, բերքի հաշվառման թվական տվյալների մաթեմատիկական մշակումը կատարվել է դիսպերսիոն անալիզի վերլուծության մեթոդով, փորձի սխալի (S_x %) և ամենանվազագույն էական տարբերության ($\Delta E S$, g) որոշումով [8]:

Արդյունքներ և քննարկում: Անմոռուկի սերմերը ցանքից 4 օր անց ապահովում են 8 % ծլունակություն, իսկ 10 օր անց ծլունակությունը կազմում է ընդամենը 28%, որը շատ ցածր ցուցանիշ է: Բաց դաշտի ցանքերում նկատելի է նույն պոպուլյացիայի (հնապատի) բույսերի սերմերի ծլումը, զարնան ցանքերում՝ 15.03, աշնան ցանքերում՝ 28.02:

Աղյուսակ 1. Անմոռուկ դաշտայինի տերևառաջացման ընթացքը (ֆենոլոգիտումների միջին տվյալներ)

Ֆենոփուլ	Ցանք	Ծլում	Առաջին տերևի առաջացում	Ինքնաձուլ թիվի տերևների թիվը, հատ							
				3	5	7	11	15	17	21	25
Գարուն 2010թ.	5.03	15.03	19.03	21.03	24.03	26.03	29.03	2.04	4.04	7.04	-
Աշուն 2009թ.	20.11	28.02	2.03	6.03	8.03	10.03	13.03	15.03	18.03	23.03	-
2-րդ տարի աշուն	-	-	-	3.03	5.03	8.03	11.03	14.03	16.03	18.03	21.03

Աղյուսակ 2. Անմոռուկ դաշտայինի ֆենոփուլային անցումները գեներացիայի ժամանակ /միջին տվյալներ/

Վեգետացիայի տարին	Ցանքի ժամկետը	Ծաղկացողությունների առաջացումը	Ծաղկման փուլ		Սերմերի հատումացում
			սկիզբ	վերջ	
Առաջին	Գարուն	10.04-25.05	5.05-	30.05	14.05-24.06
	Աշուն	20.03-7.05	6.04	22.05	15.04-10.06
Երկրորդ (աշուն)		18.03-02.05	30.03	5.05	8.04-01.06

Ֆենոլոգիական դիտումները (աղ.1) ցույց տվեցին, որ այս բույսերի տերևային վարդակները կարճ ժամանակահատվածում են ձևավորվում: Գարնան ցանքերում դա տեղի է ունենում մարտից ապրիլի առաջին տասնօրյակում, աշնան և երկրորդ տարվա ցանքերում՝ /աշնան/ մարտի երկրորդ կեսին /21.03-23.03/: Ընդ որում, նշված ժամանակահատվածում բույսի վարդակները օգտագործում են ժենգյալով հացի մեջ: Վեգետացիայի առաջին տարում ձևավորվում են միջինը 20 տերև, վարդակի ստո-

րին տերևները հերթով փտում են, որոնց փոխարեն առաջանում են նորերը: Սակայն, ըստ հաշվարկների, յուրաքանչյուր բույս վեգետացիայի ընթացքում ձևավորում է 50-60 տերև /երկրորդ տարի/: Աշնան ցանքի բույսերի վարդակները մեծ թվով տերևներից են բաղկացած լինում /միջինը 25-35/, տերևառաջացման գործընթացը ավելի արագ է կատարվում, տերևները ավելի նուրբ և կանաչ են լինում: Գարնան ցանքերում վարդակի տերևների քանակը տատանվում է միջինը՝ 15-20 հատ: Ծաղկացողությունների առաջացումը (աղ.2) գարնան ցանքում համընկնում է ապրիլի 10-ից մինչև մայիսի երկրորդ կեսին, իսկ աշնան և երկրորդ տարվա ցանքերում մարտի երկրորդ կեսից /18.03-20.03/ մինչև մայիսի սկիզբը /2.05-7.05/ (նկ.1): Ծաղկացողությունների քանակը վարդակներում տարբեր է, գարնան և աշնան ցանքերում առաջին տարում տատանվում է 6-11 հատ և ունեն մեծ տերևային մակերես՝ 3120-4940 սմ², երկրորդ տարում /աշնան ցանք/ ծաղկացողությունների քանակը արդեն հասնում է 9-13 հատի և, հետևապես, կազմում է տերևային 6520 սմ² մակերես: Երկրորդ տարում մարգերը /և՛ աշնան, և՛ գարնան/ ավելի խիտ են լինում, փարթամ: Ծաղկացողությունների տերևները հիմնականում կոշտ են լինում և ժենգյալով հացի մեջ չեն օգտագործվում (աղ.3):

Աղյուսակ 3. Անմոռուկ դաշտայինի կենսաչափական միջին տվյալները

Ֆենոփուլ	Ցանքի ժամկետը Ցուցանիշ	Գարուն 2010 թ.	Աշուն 2009 թ.	2-րդ տարի (աշուն)	Բնական ցանք
Դիտումներ		2010 թ.	2010 թ.	2011 թ.	2010-2011 թթ.
Տերևների թիվը	Վարդակը կազմված է				
3	տերևային մակ.,սմ ²	31	35	36.5	29
	արմատ երկ.,սմ	7	6	14	6.3
	վարդակի կշիռը, գ	0.9	1	1.1	0.8
5	տերևային մակ., սմ ²	55.5	59.4	61	52
	արմատ երկ., սմ	10	9	15	9
	վարդակի կշիռը, գ	1.5	1.6	1.8	1.3
7	տերևային մակ., սմ ²	79.1	81	84	75.2
	արմատ երկ.,սմ	13	12	17	12
	վարդակի կշիռը, գ	2.2	2.4	2.3	2
11	տերևային մակ., սմ ²	129.8	131	136.9	124
	արմատ երկ.,սմ	15	16	18	14
	վարդակի կշիռը, գ	2.9	3	3.2	2.7
15	տերևային մակ., սմ ²	187.5	190	197	181
	արմատ. երկ.,սմ	13	17	17	16
	վարդակի կշիռը, գ	4	4.2	4.5	3.9
17	տերևային մակ.,սմ ²	221	227	235	209
	արմատ. երկ.,սմ	15	19	21	20
	վարդակի կշիռը, գ	4.6	4.7	4.9	4.4
21	տերևային մակ.,սմ ²	278.5	280	296	261.5
	արմատ. երկ.,սմ	17	20	23	19
	վարդակի կշիռը, գ	5.2	5.3	5.3	5
25	տերևային մակ.,սմ ²	-	-	360.5	318.2
	վարդակի կշիռը, գ	-	-	6.2	5.8

Մեր կողմից կատարված ցանքերում ծաղկացողությունները ուղղաձիգ են (պատճառը մարգերի խիտ լինելն է), հիմնականում ծաղկման շրջանի վերջում են տարածվում գետնին, այնինչ վայրած ձևերի ծաղկացողությունները հիմնականում գետնատարած են լինում: Մարգերում միայն 70-75 սմ բարձրության դեպքում բույսերը փռվում են գետնին: Գարնան և աշնան ցանքերում բույսերը հասնում են 74-98 սմ (միջինը 80 սմ) երկրորդ տարում մինչև 109 սմ, վայրած ձևերինը՝ մինչև 95 սմ բարձրության: Ծաղկացողունի հետագա աճն ընթանում է տերևների քանակի չնչին ավելացմամբ և միջհանգուցային տարածության մեծացմամբ:

Աղյուսակ 4. Անմոռուկ դաշտայինի կենսաչափական տվյալները գեներացիայի ընթացքում

Վեգետացիայի տարին	Ցանքի ժամկետը	Ծաղկացողունների առաջացում		Ծաղկման փուլ						Սերմերի հատումնա-ցում
		Տերևային մակերես, սմ ²	Ծաղկացող. բարձր. և տրամ սմ/սմ	Սերմերի թիվը	Ցող. տերևների թիվը, հատ	Ծաղկակիր ցող. թիվը, հատ	Բույսի բարձր., սմ	Ծաղիկների թիվը, հատ 1 ցող	Արմ. երկ., սմ	
Առաջին	Գարնան ցանք 2010	2090	50	3120	20-25	6-8	74/0.3	23-60	16	4
	աշնան ցանք 2009	3456	50	4940	28-35	8-11	98/0.4	25-35	18	4
Երկրորդ (աշնան ցանք)		6320	52	6520	30-38	9-13	109/0.65	42-56	22	4
ընական ցանք		3005	49	3115	20-33	4-14	95/0.4	30-42	23	4

Ծաղկացողունների առաջացումը և ծաղկման շրջանը գրեթե միաժամանակ են ընթանում, այսինքն ծաղկման շրջանում բույսի աճը դեռ շարունակվում է: Գարնան ցանքերում ծաղկացողունների առաջացման ավարտը գրանցվում է մայիսի 25-ին, ծաղկման շրջանը՝ մայիսի 30-ին, աշնան ցանքերում ծաղկման շրջանի և ծաղկացողունների առաջացման ավարտի տարբերությունը 15 օր է, երկրորդ տարում՝ (և՛ աշնան, և՛ գարնան) գրեթե միաժամանակ է ավարտվում 3 օր տարբերությամբ:

Ծաղկումը և սերմառաջացումը սկսվում է ծաղկացողունի ստորին մասից:

Սերմերի հատումնացումը գարնան ցանքերում հիմնականում ավարտվում է հունիսի վերջերին (24.06), աշնան ցանքերում՝ հունիսի առաջին տասնօրյակում, իսկ երկրորդ տարում՝ մայիսի վերջից և հունիսի սկիզբը (1.06): Կարելի է ասել, որ անմոռուկի վեգետացիոն շրջանը տևում է 3-3.5 ամիս:

Ինչպես ցույց են տալիս փորձերը, անմոռուկի սերմերը կարելի է ցանել և՛ աշնանը, և՛ գարնանը: Աշնանացան բույսերը լավ ծմեռում են դաշտում և վաղ գարնանից արդեն պիտանի են օգտագործման համար: Սերմերը շուտ են ծլում, չնայած սերմերի ծլունակությունը շատ ցածր է: Ծլելուց հետո խնամում են սովորական ձևով՝ բաղնիքներով, փխրեցնելով և ջրելով: Հետագայում կարելի է 4-5 անգամ բերքահավաք կատարել՝ հնձելով բույսը, 1մ²-ից ստացվում է 10-15 փունջ (յուրաքանչյուրը 150 գ): Վաղահաս է, տերևային վարդակները շատ շուտ են ձևավորվում, իսկ որպես հումք ծառայում հիմնականում վարդակի տերևները: Ծաղկացողունների տերևները ընդհանրապես չեն օգտագործում սննդի մեջ, ուստի բերքահավաքը անհրաժեշտ է կատարել մարտին և ապրիլի առաջին կեսին:

Կարելի է մշակել մարգերով /շաղացան/, նեղշար՝ միջշարային տարածությունը թողնելով մինչև 25 սմ: Առաջին բերքահավաքը կատարում են բույսերը նոսրացնելով, որի ընթացքում դրանցից փնջեր են կապում (1 փունջը 150 գ), միջբուսային տարածությունը թողնելով՝ 15-17 սմ (աղ.5): Ցանկալի է մտցնել ցանքաշրջանառության մեջ, բանի որ մշակաբույսերի դաշտերում հանդես կգա որպես մոլախոտ: Բավական է մեկ անգամ դաշտում անմոռուկ մշակել, սերմերը հավաքել, միևնույն է՝ անպայման կծլեն:

Անմոռուկ *M. arvensis* (L.) Hill. Sx% - 0,9 ԱԵՏ_{0,95} -1,2 g/հա

Տնտեսական արդյունավետության հաշվարկները ցույց տվեցին, որ անմոռուկի արտադրական ցանքերի մշակումը արդյունավետ է (աղ.7):

Նրա հետագա կիրառումը կնպաստի մշակաբույսի ավելացմանը, հատկապես դրա վաղ ժամկետի բերքի ապահովմամբ: Հիմք ընդունելով կատարված ծախսերը ու մեկ միավոր արտադրանքի ինքնարժեքը, ինչպես նաև բերքի իրացումից ստացվող շահույթը, կարելի է եզրակացնել, որ շահութաբեր է:

Աղյուսակ 5. ՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱԿԱՆ ՔԱՐՏ

Աշխատանքի անվանումը	Կատարման ժամկետը առաջին տարի		Ագրոտեխնիկական պահանջը
	սկիզբ	վերջ	
Ցրտահարել	13.11	16.11	25-28 սմ խորությամբ շաղացան
Խոր վար և փոցխում	5.03	8.03	
Աշնան ցանք	18.11	20.11	
Գարնան ցանք	10.03	12.03	
Ջրում	ըստ անհրաժեշտության		5-6անգամ 500-600 մ ³ /հա ջրման նորմայով
Նոսրացում	20.03	22.03	միջբուսային տարածությունը թողնել 15-17 սմ
Միջշարային կոլտիվացիա /ակոսների թարմացում/	5.04	8.04	12-15 սմ խորությամբ,
Տերևների բերքահավաք /պարբերաբար/	18.03	20.04	Նուրբ, առողջ, հյութալի, ամբողջական, տերևները հեռացվում են դեղնած, կոշտացած տերևները
Բերքի տեսակավորում և տեղափոխում	բերքահավաքի ընթացքում		
Երկրորդ տարի			
Միջշարային 1-ին կոլտիվացիա	3.03	5.03	12-15 սմ խորությամբ
Ջրում	ըստ անհրաժեշտության		5-6 անգամ 500-600 մ ³ /հա ջրման նորմայով
Միջշարային 2-րդ կոլտիվացիա	28.03	31.03	12-15 սմ
Տերևների բերքահավաք /պարբերաբար/	5.03	15.04	Նուրբ, առողջ, հյութալի, ամբողջական, տերևները
Բերքի տեսակավորում և տեղափոխում	Բերքահավաքի ընթացքում		Հեռացվում են դեղնած, կոշ- տացած և պատառոտված տերևները

Աղյուսակ 6. Անմոռուկ դաշտայինի բերքատվությունը

1 բույսից բերքը, գ	Ընդհանուր բերքը, գ/հա	Որից ապրանքային		Փնջերի	Քիմիական կազմը		
				բանակը	Վիտամին C	Կարոտին	
		գ/հա	%	հատ 1, մ ²	մգ %	մգ %	
22	2	220	190	90.4	10-15	42	12

Աղյուսակ 7. Անմոռուկ դաշտայինի մշակության տնտեսական արդյունավետությունը

Բերքատվությունը, գ/հա	Կատարված ծախսերը 1 հա հաշվարկով, հազ.դր.	1 ց-ի հաշվով /հազ. դրամ/			Շահույթը հատի հաշվով, հազար դրամ
		Ինքնարժեքը	իրացման գինը	շահույթը	
220	418,0	1.9	3.5	1.6	352.0

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. *Աբրահամյան Ե., Աբրահամյան Ն.* Արցախյան դեղաբույսեր, ՏՍՈՒԱ՝ գրահրատակչություն, 2011
2. *Авиценна*, Канон врачебной науки, Многоатомник, Ташкент, 1979-1981гг.
3. *Алексеев Б.Д. Важнейшие дикорастущие полезные растения Дагестана. Махачкала: Датгосиздат, 1967.*
4. Атлас ареалов и ресурсов лекарственных растений СССР, под ред. А.И.Толмачева, М., ГУГК, 1976.
5. *Брежнев Д.Д.* Мировые растительные ресурсы на службе народного хозяйства СССР. Тр. 5. По приклад. Бот. Ген. И селекции. 60, 1977.
6. *Губанов И.А., Крылова В.Л.* Дикорастущие полезные растения СССР, М., 1976.
7. *Губанов И.А. и др. Иллюстрированный определитель растений Средней России, 2, 2003.*
8. *Доспехов Б.А.* Методика полевого опыта. М., Колос, 1968.
9. *Новиков В.С., Губанов И.А.* Популярный атлас – определитель. Дикорастущие растения, М., 2008.
10. *Петров В.А.* Этноботаника Нагорного Карабаха. Баку, 1940.

Ստացվել է 20.10.2015

Биолог. журн. Армении, 2 (68), 2016

АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА НЕКОТОРЫХ ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИХ ГЕТЕРОЦИКЛОВ НА ОСНОВЕ ПИРИМИДИНА И БЕНЗИМИДАЗОЛА

А.А. АРУТЮНЯН, Дж.А. АВАКИМЯН, Г.М. СТЕПАНЯН

Научно-технологический центр органической и фармацевтической химии
НАН РА, Институт тонкой органической химии им. А.Л. Мнджояна
harutyunyan.arthur@yahoo.com

Изучены антибактериальные свойства новых производных гетероциклических систем имидазо-и бензо[4',5']имидазо[2',1':6,1]пиридо[2,3-d]пиримидинов, 4,10-дигидро-бензо[4',5']имидазо[1,2-a]пиримидин-4-онов, бензимидазо[2,1-b]хиназолин-12(5H)-онов и пиридо[1,2-a]пиридо[1'',2'':1',2']пиримидо[5',4':5,6]пирано[2,3-d]пиримидина по отношению к некоторым штаммам грамположительных и грамотрицательных бактерий. Установлено, что три- и тетрациклические производные проявляют определенную активность по отношению к некоторым штаммам бактерий.

*Полициклические гетероциклы – антибактериальная активность –
связь структура – активность*

Ուսումնասիրվել է խմիղագո- և բենզոլ[4',5']խմիղագո[2',1':6,1]պիրիդոլ[2,3-ժ]պիրո-միդիկներ, 4,10-դիփիրոբենզոլ[4,5]խմիղագո[1',2-ալյաիրմիդիկ-4-օնի, բենզոլխմիղագո[2,1-նի]խնազոլի-12(5H)- ունի և պիրիդոլ[1,2-ալյաիրմիդիկ[1',2':1',2']պիրո-միդիկ[4',5':6]պիրանոլ[2,3-ժ]պիրմիդիկի հետերոցիկլիկ համակարգերի նոր ածանցյալների հակամանրեային հատկությունները գրամոդալական և գորմաբանաական մանրէների չորս շտամմերի նկատմամբ: Ցույց է տրվել, որ եռեթ- և չորսցիկլիկ որոշ ածանցյալներ օւնաբետում են չափավոր հակամանրեային ակտիվություն:

Պոլիցիկլիկ հետերոցիկլներ – հակամանրեային ակտիվություն – կառուցվածք – ակտիվություն կապ

The antibacterial properties of the new derivatives of the heterocyclic systems imidazo- and benzo[4',5']imidazo[2',1':6,1]pyrido[2,3-d]pyrimidine, 4,10-dihydrobenzo[4,5]imidazo[1,2-a]pyrimidin-4-ones, benzimidazo[2,11-b]quinazolin-12(5H)-ones and pyrido[1,2-a]pyrido[1'',2'':1',2']pyrimido[5',4':5,6]pyrano[2,3-d]pyrimidines have been investigated. It has been revealed that some of tri- and tetracyclic heterocyclic derivatives display antibacterial activity in respect of some gram-positive and gram-negative bacteria.

Polycyclic heterocycles – antibacterial activity – structure – activity relationships

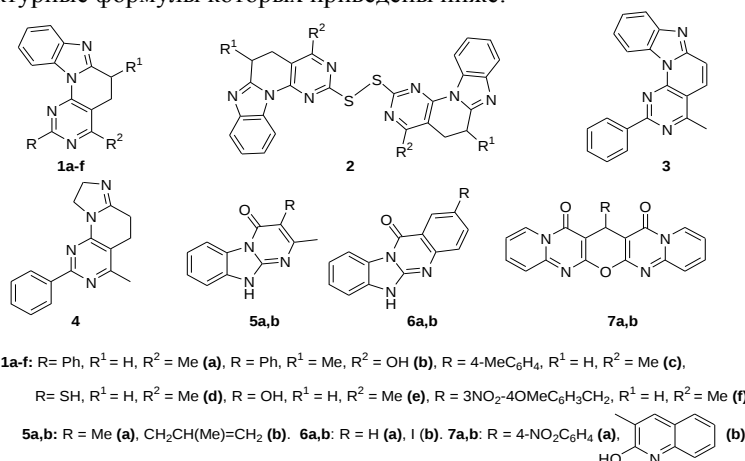
Полициклические конденсированные пиримидины и бензимидазолы – интенсивно изучаемый класс гетероциклов, многие производные которых проявляют широкий спектр биологической активности и входят в состав ряда лекарственных препаратов [5, 6].

Известно, что пиримидины и конденсированные пиримидины (пурины) являются абсолютно необходимыми компонентами всех живых организмов, в связи с чем их структурные аналоги рассматриваются в качестве потенциальных антиметаболитов нуклеинового обмена и перспективных скаффолдов в поиске соединений биомедицинского применения.

Бензимидазолы, являясь изостерами пуринов, также проявляют интересный спектр биологической активности и являются основой ряда лекарственных препаратов и, в частности антигельминтных, таких как мебендазол и др [7].

В этой связи можно предположить, что производные бензимидазопиримидинов и бензимидазохиназолинов, объединяющие в структуре элементы двух разных фармакофоров – пиримидина и бензимидазола, а также производные других три- и пентациклических азаетероциклов, могут рассматриваться как антиметаболиты и проявлять определенные антибактериальные свойства.

С учетом вышеизложенного, целью настоящей работы являлось изучение антибактериальной активности ряда новых производных три-, тетра- и пентациклических азаетероциклов: замещенных бензо[4',5']имидазо- и имидазо-[2',1':6,1]пиридо[2,3-d]пиримидинов **1a-f**, **2**, **3**, **4**, 4,10-дигидробензо[4',5']имидазо[1,2-a]пиримидин-4-онов **5a,b**, бензимидазо[2,1-b]хиназолин-12(5H)-онов **6a, b** и пиридо[1,2-a]пиридо[1'',2'':1',2']пиримидо[5',4':5,6]пирано[2,3-d]пиримидина **7a, b** [1], структурные формулы которых приведены ниже:



Материал и методика. Антибактериальную активность соединений **1a-f** - **4**, **5a,b**, **6a,b**, **7a,b** изучали методами “диффузии в агаре” и “двукратных серийных разведений” на мясоептонном бульоне (pH 7,2-7,4) [3,4] при бактериальной нагрузке 20 млн. микробных тел на 1 мл среды. В экспериментах использовали стандартные эталонные штаммы микроорганизмов (Государственный контрольный институт медицинских биологических препаратов им. Л.А.Тарасевича, Россия): отличающиеся по чувствительности к антибактериальным препаратам два штамма грамположительных стафилококков (*Staphylococcus aureus* 209p и *S. aureus* 1) и грамотрицательные палочки (*Shigella flexneri* 6858, *Escherichia coli* 0-55). При диффузионном методе растворы соединений и контрольного препарата готовили в ДМСО в разведении 1:20. В чашках Петри одинакового диаметра разливали расплавленные среды в два слоя. Для нижнего слоя использовали незасеянные среды в количестве 10 мл, для верхнего слоя – агаровую среду с предварительно засеянной соответствующей тест-культурой. После застывания засеянного агара на его поверхности расставляли 6 стерильных цилиндров из нержавеющей стали одинакового веса и размера (6 x 10 мм). В цилиндрики каждой чашки одновременно пипеткой наносили 0,1мл раствора испытуемых веществ в ДМСО (концентрация 50мг/мл). Учет результатов производили по диаметру (d, мм) зоны отсутст-

вия роста микробов на месте нанесения веществ после суточного выращивания тест-культур в термостате при 37 °С.

В методе серийных разведений на каждый подопытный микроорганизм составляли ряды по 7-8 пробирок, содержащие питательную среду с различными концентрациями испытуемых веществ, начиная с концентрации 1 мг/мл. Пробирки засевали одинаковым количеством бактериальной взвеси, приготовленной из 18-часовой культуры микроорганизмов. Результаты опытов учитывали визуально по наличию и по интенсивности роста после суточной инкубации в термостате при 37°С. За действующую дозу принимали ту наименьшую концентрацию вещества в мкг/мл, которая в состоянии ингибировать рост микроорганизмов (минимальная ингибирующая концентрация, МИК). В качестве положительного контроля в аналогичных условиях использовали лекарственный препарат фуразолидон [2] (0,1 мл раствора, концентрация 50 мг/мл).

Результаты и обсуждение. Исследования антибактериальной активности соединений методом “диффузии в агаре” показали, что, за исключением вещества **1a**, они обладают противомикробными свойствами. При этом соединения **1b**, **3**, **4** и **5a** проявляют умеренную активность по отношению к грамположительным штаммам, подавляя рост микробов в зоне диаметром 15-20 мм (табл.1) и меньшую активность по отношению к грамотрицательным штаммам.

Таблица 1. Антибактериальная активность соединений

Соединение	Диаметр зоны отсутствия роста микробов (мм)			
	<i>S. aureus</i>		<i>S. flexneri</i> 6858	<i>E. coli</i> 0-55
	209p	1		
1a	0	0	0	0
1b	16	20	13	13
1c	12	12	10	10
1d	12	10	10	10
1e	14	13	14	10
1f	14	12	13	12
2	12	10	12	12
3	18	20	15	15
4	16	19	15	15
5a	16	15	13	14
5b	11	11	10	10
6a	14	12	13	12
6b	14	12	13	12
7a	10	13	13	12
7b	13	13	14	12
Фуразолидон	25	24	24	24

Интересно, что дегирирование совершенно неактивного соединения **1a**, приводящее к ароматическому производному **3**, сопровождается появлением у него умеренных антибактериальных свойств. Остальные соединения обладают слабой противомикробной активностью (d =10-14 мм). Наиболее активные вещества были изучены методом “двухкратных серийных разведений” на вышеуказанных штаммах. Исследования этим методом показали, что только соединения **1b**, **3**, **4** и **5a** подавляют рост стафилококков в концентрации 125 мкг/мл, в то время как остальные вещества проявляют противомикробную активность в значительно более высокой концентрации – 500 мкг/мл и выше (табл. 2).

Таблица 2. Минимальная ингибирующая концентрация соединений (МИК), мкг/мл

Соединение	<i>S. aureus</i>		<i>S. Flexneri</i> 6858	<i>E.coli</i> 0-55
	209p	1		
1b	125	125	>1000	>1000
1e	500	>1000	1000	>1000
1f	1000	>1000	>1000	>1000
3	125	125	500	500
4	125	125	500	555
5a	125	250	>1000	>1000
6a	1000	>1000	>1000	>1000
6b	1000	>1000	>1000	>1000
Фуразолидон	31,2	31,2	31,2	31,2

Показательно, что при некоторых модификациях совершенно неактивного гетероцикла **1a** получен ряд биологически активных соединений. Так, замена 4-метильной группы соединения **1a** на полярную ОН-группу (соединение **1b**), окислительная ароматизация с появлением кратной связи в положении 5,6 (соединение **3**) или замещение всего ароматического фрагмента остатка бензимидазола на СН₂-СН₂-группу (соединение **4**) приводят к появлению у всех трех соединений заметных антибактериальных свойств. Следует отметить, что изученные вещества по активности уступают контрольному препарату фуразолидону (d = 24-25 мм; МИК = 31.2 мкг/мл).

Таким образом, в ряду полициклических азаетероциклов некоторые производные бензо[4',5']имидазо-, имидазо[2',1':6,1]пиридо[2,3-d]пиримидинов и бензо[4',5']имидазо[1,2-a]пиримидинов обладают умеренными антибактериальными свойствами, которые усиливаются в результате химических модификаций, что подтверждает целесообразность продолжения исследований в данном направлении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арутюнян А.А., Паносян Г.А., Галстян М.В., Пароникян Р.В., Степанян Г.М., Сукасян Р.С., Григорян А.С. Синтез новых пиримидинов и поликонденсированных азаетероциклов. В сб. "Некоторые успехи органической и фармацевтической химии". Сб. трудов, выпуск 2, с.299-310. Ереван, 2015.
2. Машковский М.Д. Лекарственные средства. М., Новая Волна, с. 851, 2010.
3. Перишин Г.Н. Методы экспериментальной химиотерапии. М., Медицина, сс.507-533, 1971.
4. Руководство по проведению доклинических лекарственных средств. Под ред. Миронова А.Н. М., Медицина, сс.509-524, 2012.
5. Arikatt S.D., Mathew B.V, Joseph J., Chandran M., Bhat A.R., Krishnakumar K. Pyrimidine derivatives and its biological potential – a review. Int. J. Org. Bioorg. Chem., 4,1, pp. 1-5, 2014.
6. Asif M. The pharmacological importance of some diazine containing drug molecules. SOP Trans. Org. Chem., 1, 1, pp. 1-16, 2014.
7. Yadav G., Ganguly S. Structure activity relationship (SAR) study of benzimidazole scaffold for different biological activities: A mini-review. Eur. J. Med. Chem., 97,5, pp. 419-443, 2015.

Поступила 20.01.2016



Biolog. Journal of Armenia, 2 (68), 2016

THE RELATIONSHIP BETWEEN ARGINASE ACTIVITY AND CHANGE OF POLYAMINES QUANTITY IN HUMAN BLOOD SERUM DURING BREAST CANCER

N.V. AVTANDILYAN¹, S.A. KARAPETYAN¹, K.A. ALEKSANYAN²

¹ Yerevan State University, Department of Biochemistry

² Clinical-biochemical laboratory at National Center of Oncology aft. V.A.Fanarjyan
nv.avtandilyan@ysu.am

Cancer cells may differ from their normal counterparts in the activities of certain enzymes. That difference may act as a useful biological marker of malignancy in particular tumors. Arginase (EC 3.5.3.1) hydrolyses L-arginine into urea and L-ornithine (precursor for polyamines). The enzyme activity as a test for cancer diagnosis and treatment is suggested. The main goal of the study is not only to reveal a new tumor marker, but also to clarify new relationship mechanisms between Arginase activity and change of polyamines quantity in healthy and cancer cells, which will allow influencing metabolic different processes of cancer cells.

Arginase – polyamine – breast cancer – diagnosis and treatment

Քաղցկեղային բջիջները կարող են տարբերվել իրենց առողջ անալոգներից որոշակի ֆերմենտների ակտիվությամբ: Այդ կենսաբանական ցուցանիշը կարող է ծառայել որպես մարկեր տվյալ ուռուցքի չարորակության գնահատման համար: Արգինազը (EC 3.5.3.1) կատալիզում է L-արգինինի հիդրոլիզը L-օրնիթինի (պոլիամինների նախակազմ) և միզանյութի առաջացումը: Ենթադրվում է, որ արգինազի ակտիվության արժեքը կարող է կիրառվել որպես դիագնոստիկ թեստ քաղցկեղի ախտորոշման և բուժման նպատակով: Աշխատանքի հիմնական նպատակը ոչ միայն նոր ուռուցքային մարկերի բացահայտումն է, այլ նաև արգինազի ակտիվության և պոլիամինների քանակական փոփոխության փոխկապակցվածության նոր մեխանիզմների պարզաբանումը առողջ և քաղցկեղային բջջում, ինչը թույլ կտա միջամտել քաղցկեղային բջիջների նյութափոխանակային տարբեր պրոցեսներին:

Արգինազ – պոլիամին – կրծքագեղձի քաղցկեղ – ախտորոշում և բուժում

Раковые клетки отличаются от здоровых аналогов активностью некоторых ферментов. Этот биологический индикатор может служить маркером для оценки качества опухоли. Аргиназа (EC 3.5.3.1) катализирует гидролиз L-аргинина в L-орнитин (предшественник полиаминов) и мочевины. Предполагается, что уровень ферментативной активности аргиназы может быть использован в качестве теста для диагностики и лечения рака. Наша основная цель заключается не только в открытии нового опухолевого маркера, но и в изучении новых механизмов взаимосвязи между аргиназной активностью и изменением количества полиаминов в здоровых и раковых клетках, которые позволят выяснить некоторые метаболические процессы в раковых клетках.

Аргиназа – полиамины – рак молочной железы – диагностика и лечение

Great medical and biological efforts are continually invested into understanding of cancers pathology and finding new methods for its diagnosis and treatment [1]. Cancer cells may differ from their normal counterparts in the activities or concentration of certain enzymes. The application of measures correlating the activities of such enzymes may lead to elucidation of therapeutic approaches to cancer [14]. Arginase (EC 3.5.3.1) hydrolyses L-arginine into urea and L-ornithine (polyamines precursor) [6, 10]. Our goal to investigate Arginase activity in blood serum during different stages of breast cancer, suggesting the enzyme activity as a test for cancer diagnosis and treatment [7, 11, 16]. Currently are shown rapid growth of polyamines (spermine, spermidine, putrescine) quantity in blood serum and urine during malignant tumors in different organs [15]. As polyamines are essential for cell growth, one of the mechanisms by which polyamines accelerate tumor growth is through the increased availability of this indispensable growth factor [17]. In addition, polyamines seem to accelerate tumor invasion and metastasis not only by suppressing immune system activity against established (already existing) tumors but also by enhancing the ability of invasive and metastatic capability of cancer cells [12]. Currently are actual research works about the clarification of Arginase isoforms function in polyamines biosynthesis [5, 8]. Polyamines which are putrescine, spermidine and spermine are alkaline aliphatic amines, which electrostatically interact with macromolecules and modulate their biosynthesis, cell proliferation and apoptosis [9, 17]. Cancer cells produce proteases to destroy the surrounding matrix, and produce proteins to create new vessels. Hypoxic cancer cells lose their adhesion characteristics and have enhanced capacity for migration. Polyamines synthesized by cancer cells are transferred to cancer cells under hypoxic conditions that have increased capacity for polyamine uptake and decreased intracellular polyamine synthesis. Increased polyamine uptake by immune cells results in decreased production of tumoricidal cytokines and the amount of adhesion molecules, and these eventually attenuate the cytotoxic activities of immune cells [12]. The levels of Arginase activity and polyamines quantity in malignant tissues were reported by several scientists to be increased compared with healthy tissues [7, 15, 16]. However, besides the limited number of these studies, none of authors traced the relation between Arginase isoenzymes activity and biological behavior of tumors and polyamines quantity. Therefore, the present study was designed not only to determine Arginase activity levels in cancer tissues but also to correlate them with biological behavior of this tumor. There are two distinct isoforms of Arginase: Arginase I or ureotelic Arginase and Arginase II or nonureotelic Arginase, which have similar enzymatic features, but different cell localization and tissue distribution, amino acid sequence structure (53% is the same) and radically different *pI* value [10, 13]. The previous studies of our laboratory were to reveal the role of Arginase isoenzymes in polyamines biosynthesis in rats. It was shown that the necessary amount of ornithine for the biosynthesis of polyamines is provided via Arginase II [3, 4]. Before coming to the above mentioned conclusion we have identified two important facts. The kinetic studies of ureotelic and nonureotelic Arginases have shown that AII has a special stereospecific part which bind polyamines in contrast to ureotelic Arginase. It was shown proportionate decrease of polyamines amount during inhibition of nonureotelic Arginase with N^G-hydroxy-L-arginine.

Materials and methods. This study is performed with blood serum of patients with breast cancers who were hospitalized in the National Center of Oncology aft. V.A.Fanarjyan. The most common system used to describe the stages of different types of cancers is the American Joint Committee on Cancer TNM system. Arginase activity is determined in blood serum of 7 healthy individuals and patients with breast cancer (28 patients, I-III stages, 37-72 years old).

Separation and purification of Arginase isoenzymes. The method of Kossman (1966) was used with some modifications. On the blood serum 0,2M Glycine buffer, pH 9,5 was added. In the column (2,5×50 cm) containing Sephadex G-150 the blood serum - 0,2M Glycine buffer mixture was added. The column was balanced with Na-phosphate buffer (pH 7,2) and 40 fractions each one of 4 ml were collected. 4 ml of high-molecular-weight protein fraction after gel-filtration is passed through the column CM-cellulose (1.5x35 cm), balanced against 0.005 M Tris-HCl buffer, pH 7.2, elution gradiented with the same buffer gradual increasing of molarity from 0.05 to 0.25 M KCl, elution speed is 24 ml/h, was collected 32 fractions each one of 4 ml.

Archibald's method for Arginase activity determination. The method of Van Slyke and Archibald (1946) was used with some modifications. In test-tube is added 1.5ml 0.2M Glycine buffer, 0.5ml blood serum, 0.2ml 5μM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.4ml 50μM L-arginine. Enzyme catalysis was stopped with 1ml 20% trichloroacetic acid. In supernatant is determined the final product of the catalysis which is urea. Add in a test-tube 2.5ml acidic mixture (3 parts of concentrated H_3PO_4 , one part of concentrated H_2SO_4 , 0.237g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.7ml 0.1M FeCl_3 , 398ml distilled water), 1ml supernatant, 0.25ml 3% DAMO (diacetyl monoxime) and boil it in water bath 45 minutes. The intensity obtained yellow color measure with spectrophotometer in 487nm (Genesys 10, USA) [2]. Activity of enzyme is evaluated with the received urea, in micromoles for 1ml fresh tissue.

Dansylation and thin layer chromatography (TLC) analysis. The method of Seiler (1970) and Khan (2006) was used with some modifications as follows. Tissues were extracted in 0.2M cold HClO_4 at a ratio of about 100 mg/ml HClO_4 . After extraction for 1 h in an ice bath, samples were pelleted at 11.500g x 20 min in +4°C. 200 μl of HClO_4 extract were mixed with 400 μl of dansyl chloride (5 mg/ml in acetone), and 200μl of saturated sodium carbonate were added. After brief vortexing, the mixture was incubated in darkness at room temperature overnight. Excess dansyl (5-(Dimethylamino) naphthalene-1-sulfonyl chloride) was removed by reaction with 100 μl (100mg/ml) of added proline, and incubation for 30 min. Dansylpolyamines were extracted in 0.5 ml benzene, and vortexed for 30s. Up to 50μl of dansylated extract were loaded on the preadsorbent zone of silica gel plates, and the chromatogram was developed for about 1h with chloroform/triethylamine (25:2, v/v) solvent system. The R_F values were calculated using the formula, R_F = distance traveled by solute spot/distance traveled by solvent front. The dansylpolyamine bands were scraped, eluted in 2 ml ethyl acetate, and quantified in 505 nm (Genesys 10, USA) [5, 15].

Statistical Analysis. Results are expressed as means ± SD and means ± SE. Results are examined by Student's t-test (single sample) using Statistica software (StatSoft 10.0).

Results and Discussion. Arginase activity was determined in blood serum of patients with breast cancer in different stages: 10 cases were stage I (56 ± 9 , $T_1N_0M_0$, 1-2 cm), 10 cases had stage II (48 ± 11 , $T_{1-2}N_1M_0$, 2-2.7 cm), 8 cases had stage III (56 ± 12 , $T_{2-3}N_{1-3}M_0$, 4.3-5.4 cm) (tab. 1).

Table 1. Demographic characteristics of patients with breast cancers

Patients	Sex	Age	Cancer	Stage	TNM
7	Female	50 ± 8	-	-	-
10		56 ± 9	breast	I	$T_1N_0M_0$
10		48 ± 11	breast	II	$T_{1-2}N_1M_0$
8		56 ± 12	breast	III	$T_{2-3}N_{1-3}M_0$

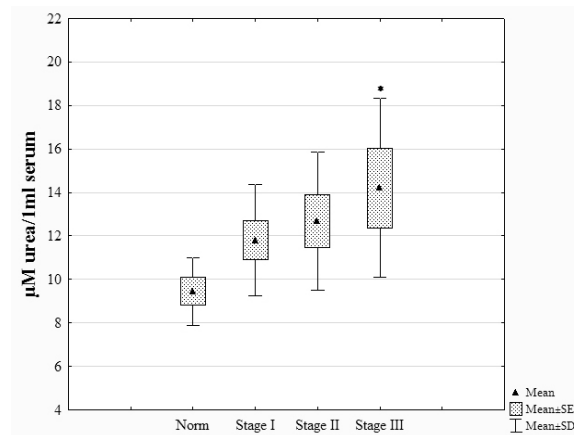


Fig. 1. The change of Arginase activity in womens' serum during different stage of breast cancer ($p < 0.001$). Breast cancer group patients: 10 cases were stage I ($T_1N_0M_0$), 10 cases had stage II ($T_{1-2}N_1M_0$), 8 cases had stage III ($T_{2-3}N_{1-3}M_0$), * - $p < 0.05$.

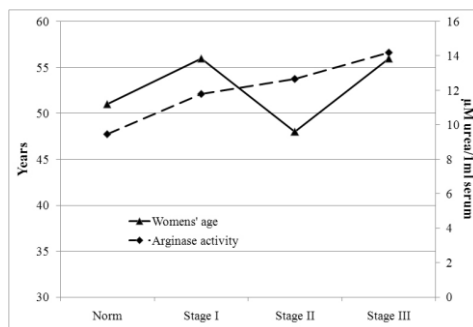


Fig. 2. The correlation between Arginase activity, cancer stage and human age in blood serum at breast malignant tumors

Our studies have shown that in women breast cancer group of stage I activity of serum Arginase was increased by 28.8%, in group of stage II by 36.1% and group of stage III by 48.4% comparing to the healthy women group (fig. 1).

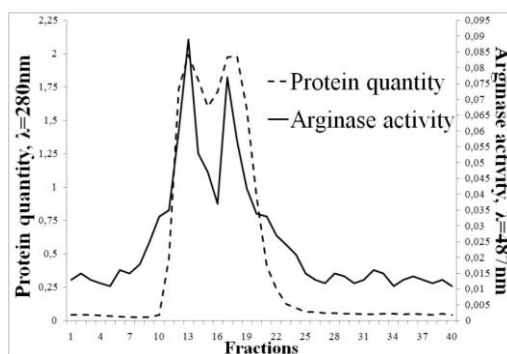


Fig. 3. The spectrum of Arginase isoenzymes and protein quantity after gel-filtration (Sephadex G-150) in blood serum of healthy patients ($n=5$, $p < 0.05$).

Studies have shown that there is no correlation between human age and Arginase activity changes: consistent pattern for stage 1-3 does not change (fig.2). Consequently, the more advanced the breast cancer, the higher the level of serum Arginase activity. It has been reported that the mean activity of Arginase is high in the early stages and higher in the advanced states of the malignant group compared to those of the normal ones.

We have tested the Arginase activity and protein quantity spectrum in blood serum of patients with breast cancer (3 patients, II stage) through gel filtration (Sephadex G-150) and ion-exchange chromatography (CM-cellulose). The spectrum of Arginase isoenzyme and protein quantity in blood serum of healthy patient after gel-filtration (Sephadex G150) we have two peaks, respectively in protein fractions number 13th and 17th (fig. 3). Both fractions were separated with CM-cellulose. After ion-exchange chromatography of 13th fraction, we have two peaks for protein quantity and arginaes isoenzyme (fig. 5).

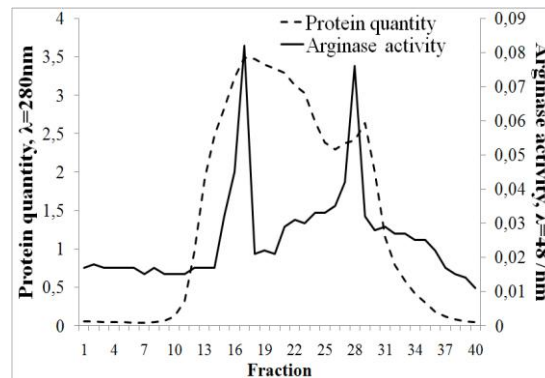


Fig. 4. The The spectrum of Arginase isoenzymes and protein quantity after gel-filtration (Sephadex G-150) in blood serum of patients with breast cancer (n=5, p<0,05).

In blood serum of patients with breast cancer after gel-filtration (Sephadex G150) we have two peaks, respectively 17th and 29th in protein fractions of protein quantity and Arginase isoforms spectrums (fig. 4). In contrast to the standard peaks are shifted to the right. In 17th and 29th fractions Arginase activity was increased respectively by 43.9% and 33.5%. The 17th high molecular fraction was separated by CM-cellulose.

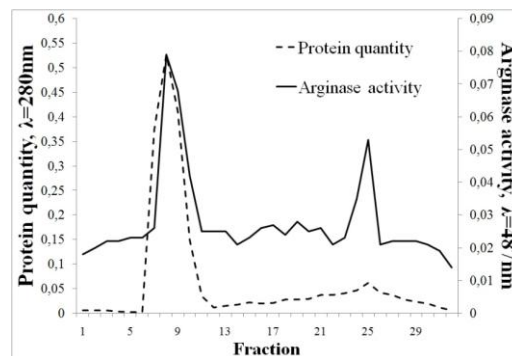


Fig.5. The spectrum of Arginase isoenzymes and protein quantity after ion-exchange chromatography in blood serum of healthy patients (fraction N13, CM-Cellulose, during fractions 2, 9, 15, 21, 27-0.05M, 0.1M, 0.15M, 0.2M and 0.25M KCl respectively, n=5, p<0,05).

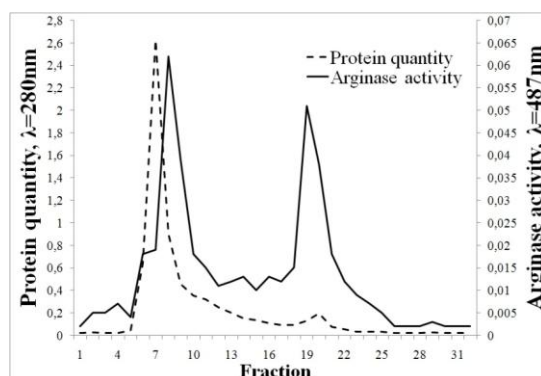


Fig.6. The spectrum of Arginase isoenzymes and protein quantity after ion-exchange chromatography in blood serum of patients with breast cancer (fraction N17- number one peak, CM-Cellulose, during fractions 2, 9, 15, 21, 27 0.05M, 0.1M, 0.15M, 0.2M и 0.25M KCl respectively, n=5, p<0,05).

After ion-exchange chromatography we have two peaks in spectrum of Arginase isoenzyme and protein quantity, respectively in 7th and 20th fractions. Comparing to the standards the peaks are curved to the left. In contrast to the healthy patients Arginase activity in the 7th and 20th fractions Arginase activity of blood serum is increased respectively by 5.2% and 18.6% (fig. 6). These data show that after partial purification of enzymes with ion-exchange chromatography Arginase activity in fractions of patients with malignant tumors is also increased. It should be mentioned that also is changed the spectrum of Arginase activity and protein quantity.

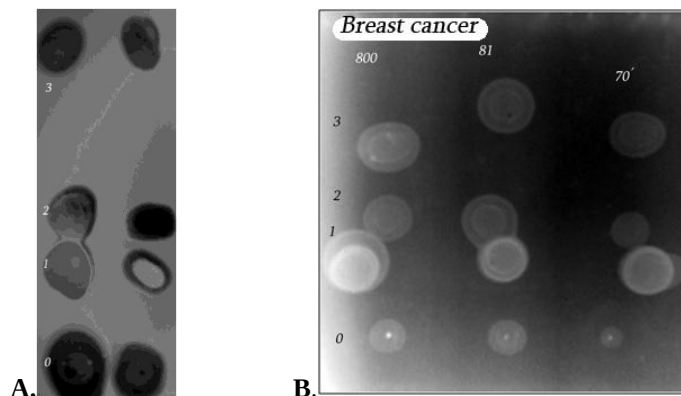


Fig.7. A. Quantitative and qualitative analysis of blood serum of a healthy (A) and breast cancer patient (B) through thin layer chromatography (A, RFSPM – 0.29, RFSPD – 0.45, RFPUT – 0.82). B – I stage (70', RFSPM – 0.3, RFSPD – 0.42, RFPUT – 0.67), II stage (81, RFSPM – 0.33, RFSPD – 0.42, RFPUT – 0.75) and III stage (800, RFSPM – 0.32, RFSPD – 0.44, RFPUT – 0.65). The quantity of polyamines is presented in nM polyamine in 50μl of experimental solution (n=5, p<0,05, 0 – origin, 1-SPM, 2-SPD and 3-PUT).

For the next stage, we have performed quantitative analysis for polyamines through thin layer chromatography in blood serum of healthy patients and patients with cancer (fig.7). The results show that polyamines quantity is increased in blood serum of patients with cancer, and the increase is corresponding to the growth of the stage of the disease (tab. 2).

Table 2. The change of polyamines quantity in blood serum of healthy patients and patients with cancer (the quantity of polyamines is presented in nM polyamine in 50µl of experimental solution), $M \pm m$, $n=5$, $p<0,05$).

Stage of disease	Polyamins	Polyamine quantity (nM polyamine in 50 µl of experimental solution)
0	PUT	12,2±2,3
	SPD	9,6±1,4
	SPM	14,3±2,4
I	PUT	17,2±3,1
	SPD	20,4±2,9
	SPM	23,6±3,8
II	PUT	20,8±2,7
	SPD	24,3±3,2
	SPM	27,4±3,7
III	PUT	22,9±2,1
	SPD	25,6±3,3
	SPM	34,8±4,2

The increase of total polyamines quantity compared with standard is 69.5%, 101% and 131%, respectively in I, II and III stages. The increase of polyamines quantity coincides with the increase of Arginase activity, what shows the correlation between them during the disease.

The practical importance of our work is through the change of nonureotelic Arginase activity, we can influence on polyamines quantity, thus influencing on cancer cell's metabolism. In our studies, a significant increase in blood serum Arginase activity could be important for the early diagnosis of mentioned cancer and for their treatment. Our results will serve for structure-based drug design, because we suggest that Arginase inhibition may have some protective effects on different types of cancers development as it inhibits ornithine levels, precursors of polyamines, and also polyamines levels. The synthesis of new inhibitor for Arginase, which will be harmless for organism, will allow us to change the course of cancer. Our further investigations will be directed to answer to the mentioned question.

REFERENCES

1. American Cancer Society. Breast Cancer. Cancer Information Database, 2015.
2. Archibald R.M. The colorimetric determination of urea. J. Biol. Chem., 167, 507, 1945.
3. Avtandilyan N.V., Karapetyan S.A., Davtyan M.A. The change of kinetics of nonureotelic Arginase under influence of exogenous polyamines in rat brain and kidney. International young scientists conference "Perspectives for Development of Molecular and Cellular Biology 3", Yerevan, Armenia, 26-29 September pp. 48-52, 2012.
4. Avtandilyan N.V., Karapetyan S.A., Davtyan M.A. Polyamines are noncompetitive inhibitors for nonureotelic Arginases in the different tissues of rats. National Academy of Sciences of RA, Electronic Journal of Natural Sciences, 20,1, pp. 7-10, 2013.
5. Avtandilyan N.V. The research of the role of nonureotelic Arginases in polyamines bio-synthesis in brain and kidney in vitro. Biolog. Journal of Armenia, 65,1, pp. 26-32, 2013.
6. Cederbaum S.D., Yu H., Grody W.W., Kern R.M., Yoo P., Iyer R.K. Arginases I and II: do their functions overlap? Mol Genet Metab., 81, S38-44, 2004.
7. Chiung-I Chang, James C. Liao, Lih Kuo. Macrophage Arginase Promotes Tumor Cell Growth and Suppresses Nitric Oxide-mediated Tumor Cytotoxicity. Cancer Research, 6, 1100-1106, 2001.

8. *Christianson D.W.* Arginase: structure, mechanism, and physiological role in male and female sexual arousal. *Acc Chem Res.*, 38, 191-201, 2005.
9. *Coleman C.S, Hu G, Pegg A.E.* Putrescine biosynthesis in mammalian tissues. *Biochem. J.*, 379, 849-855, 2004.
10. *David E. Ash.* Structure and Function of Arginases. *J. Nutr.*, 134, 2760S-2764S, 2004.
11. *Erbas H., Aydogdu N., Usta U., Erten O.* Protective role of carnitine in breast cancer via decreasing Arginase activity and increasing nitric oxide. *Cell Biol. Int.*, 31, 1414-9, 2007.
12. *Kuniyasu S.* The mechanisms by which polyamines accelerate tumor spread. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research.*, 30, 95, 2011.
13. *Morris S.M. Jr.* Arginine: beyond protein. *Am. J. Clin. Nutr.*, 83, 508S-512S, 2006.
14. National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Practice Guidelines in Oncology: Breast Cancer. Version 3. Accessed at www.nccn.org, 2014.
15. *Park M.H, Igarashi K.* Polyamines and their metabolites as diagnostic markers of human diseases. *Biomol Ther (Seoul)*, 21, 1-9, 2013.
16. *Porembaska Z., Luboinski G., Chrzanowska A., Mielczarek M., Magnuska J., Baranczyk-Kuzma A.* Arginase in patients with breast cancer. *Clin Chim Acta*, 328, 105-11, 2003.
17. *Thomas T., Thomas T.J.* Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Mol. Life Sci.*, 58, 244-58, 2001.

Received on 27.01.2016



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 2(68), 2016

ՈՐՈՇ ՖՈՒՆԿՑԻՈՆԱԼ ԽԱՆԳԱՐՈՒՄՆԵՐԻ ՇՏԿՈՒՄԸ ՈՉ ԴԵՂՈՐԱՅՔԱՅԻՆ ԲՈՒԺՄԱՆ ՄԵԹՈԴՈՎ

Ն.ՅՈՒ. ԱՂԱՄՅԱՆ

Երևանի պետական լսարան, մարդու և կենդանիների ֆիզիոլոգիայի ամբիոն
nona01011966@mail.ru

Շնչառության թուլացման ծավալի կամային օպտիմալ փոքրացման մեթոդի կիրառումը նպաստում է օրգանիզմի պաշտպանական մեխանիզմների ակտիվացմանը: Այս մեթոդը կիրառվել է բուժական ֆիզկուլտուրայի խմբերում: Արդյունքները վկայում են, որ այն բավական արդյունավետ է տարբեր ախտաբանական դրսևորումներ ունեցող ուսանողների մտավոր և ֆիզիկական աշխատունակության բարձրացման համար:

Շնչառական վարժություններ – թթվածնաբաց – կենսախնայողություն

Применение метода произвольного оптимального уменьшения минутного объема дыхания способствует активизации защитных механизмов организма. Этот метод применяли в группах лечебной физкультуры и выявили, что он очень эффективен для повышения умственной и физической работоспособности студентов, имеющих определенный фон различных патологий.

Дыхательные упражнения – гипоксия – биоэкономика

Using the method of random optimal decrease of minute volume of breathing leads to activation of organism's protective mechanisms. This method was used in the groups of curative physical training. It was revealed that the method is very effective for the increase of mental and physical work ability of students with pathological background of different physiological functions.

Respiratory training – hypoxia – bioeconomics

Մարդը իր կյանքի ընթացքում հաճախ է ենթարկվում միջավայրի անսովոր և երբեմն ծայրահեղ գործոնների ազդեցությանը և ստիպված լինում հարմարվել իրեն պարտադրված նոր պայմաններին: Օրգանիզմի հարմարվողականությունը ֆիզիոլոգիական բարդ գործընթացների ամբողջություն է, որում ընդգրկվում են կենսագործունեության նոր ռեժիմներ ապահովող մեխանիզմներ: Ֆիզիոլոգիական մեխանիզմների լարված վիճակը հանգեցնում է օրգանիզմում թթվածնային ռեժիմի խանգարման և նպաստում զանազան հիվանդությունների զարգացմանը: Այդ հիվանդությունների բուժման և կանխարգելման համար կիրառվում են տարբեր դեղամիջոցներ, որոնք հաճախ ունենում են նաև կողմնակի ազդեցություններ: Այդ պատճառով էլ մի շարք հիվանդությունների դեպքում նախընտրելի են ոչ դեղորայքային բուժման մեթոդները: Ջանքի որ օրգանիզմի հարմարվողական գործընթացներում կարևոր դեր է խաղում շնչառությունը, կիրառում են շնչառական վարժությունների մի շարք մեթոդներ (Բուտեյկոյի, Ստրելնիկովայի, Ֆրոլովի և այլն), որոնցից է նաև շնչառության թուլացման ծավալի ինքնակամ օպտիմալ փոքրացման (ՇՐԾԿՕՓ) մեթոդը: Շնչառության հաճախության ինքնակամ փոքրացման հետևանքով նվազում է շնչառության թուլացման ծավալը, որի արդյունքում օրգանիզմում

նկատվում են դրական տեղաշարժեր. ֆիզիկական ծանրաբեռնվածության ժամանակ տեղի է ունենում օրգանիզմի գործունեության վրա ծախսվող էներգիայի ինայոդոություն, բարելավվում են մտավոր ունակությունները, բարձրանում է սրտամկանի էլեկտրական ակտիվությունը [1, 2, 6]:

Նյութ և մեթոդ: Մեր հետազոտության ժամանակ ՇՐԾԿՕՓ-ի մեթոդը կիրառվել է երևանի պետական մանկավարժական համալսարանի բուժական ֆիզկուլտուրայի երկու խումբ ուսանողների մոտ (յուրաքանչյուր խմբում 15 ուսանող): Այդ երկու խմբերում էլ ընդգրկված են եղել սիրտ-անոթային և շնչառական օրգանների խանգարումներով (տարբեր տեսակի առիթմիաներ, սրտամկանի լարման խանգարումներ, բրոնխիտ), ներքին օրգանների քրոնիկական հիվանդություններով (գաստրիտ, լեղապարկի բորբոքում, երիկամային բորբոքում), տետոլոլային խանգարումներով և ալերգիկ հիվանդություններ ունեցող ուսանողներ:

Փորձի ընթացքում նրանք 7-8 վ կատարում են օդի բարակ շիթի ներշնչում այնպես, որ ներշնչման ավարտին պահպանվի դրա շարունակման հնարավորությունը: Կամային ներշնչումից հետո տեղի է ունենում ինքնաբուխ (սպոնտան) արտաշնչում, որը բերում է շնչառական մկանների ավելի արտահայտված թուլացման: Ըստ որում փորձի ժամանակ փորձարկվողներին հրահանգ է տրվում կատարել կրծքային տիպի շնչառություն, այսինքն՝ նրանց ուշադրությունը կենտրոնացվում է շնչառական մկանների աշխատանքի վրա: Փորձարկվողները վարժվում են 1 րոպեում կատարել 6, այնուհետև 4 շնչառական շարժում՝ ուշադրությունը կենտրոնացնելով շնչառական մկանների աշխատանքի վրա: Կամային դանդաղ ներշնչմանը և ինքնաբուխ արտաշնչմանը վարժվելու համար փորձարկվողները մարզվում են նաև ինքնուրույն՝ փորձից դուրս, հանգիստ վիճակում առավոտյան, կեսօրին և երեկոյան 10-ական րոպե տևողությամբ:

Վերոհիշյալ մեթոդի կիրառմամբ շնչառական վարժություններից հետո ուսանողները կատարել են բուժական ֆիզկուլտուրայի ծրագրով նախատեսված ֆիզիկական վարժություններ՝ պահպանելով շնչառական 6 շարժում մեկ րոպեում ռիթմը: Նրանցից առանձնացված ուսանողների մեկ խումբը ծառայել է որպես ստուգիչ (18 ուսանող): Ստուգիչ խմբում ընդգրկվածները շնչառական վարժություններ չեն կատարել, այլ մասնակցել են միայն ծրագրով նախատեսված ֆիզիկական վարժություններին:

Այս մեթոդի արդյունավետությունը պարզելու համար որոշվել է հետազոտվողների շնչառության հաճախությունը, թոքերի կենսական տարողությունը (չոր սպիրոմետրով), աջ և ձախ դաստակների ուժը (դինամոմետրով), կրծքավանդակի ամպլիտուդը, այսինքն՝ կրծքավանդակի շրջագծի տարբերությունը ներշնչման և արտաշնչման ժամանակ, պուլսի հաճախությունը (շոշափման եղանակով), ֆիզիկական վարժություններից առաջ, վարժություններից անմիջապես հետո և տաս րոպե հետո: Այս ցուցանիշները գրանցվել են կիսամյակի սկզբում (նախքան շնչառական վարժություններ սկսելը), և կիսամյակի վերջում, այսինքն շնչառական մարզումներից երեք ամիս հետո: Մարզումների արդյունքում կենսաինայոդության ցուցանիշը արտաքին շնչառության համար որոշվել է Ն.Ա.Աղաջանյանի առաջարկած բանաձևով [1]:

Շնչառության ինայոդությունը որոշվում է արտաքին շնչառության հաճախության և շնչառական ակտի էներգետիկ արժեքի հարաբերությամբ, որն արտահայտվում է օրգանիզմի հյուսվածքների կողմից թթվածնի յուրացումով և ածխաթթու գազի հեռացումով: Ստացված տվյալները վիճակագրական վերլուծության են ենթարկվել համապատասխան համակարգչային ծրագրով:

Արդյունքներ և քննարկում: Հետազոտության արդյունքների վերլուծությունից պարզվել է, որ երեքամսյա շնչառական մարզումներից հետո ուսումնասիրվող բոլոր ցուցանիշներում տեղի են ունեցել դրական տեղաշարժեր: Առաջին խմբի ուսանողների թոքերի կենսական տարողությունը ավելացել է 400 մլ-ով, մինչդեռ ստուգիչինը՝ ընդամենը 50մլ-ով, այսինքն շնչառական վարժությունների շնորհիվ մեծանում է կրծքավանդակի շարժունակությունը, որն էլ նպաստում է թոքերի կենսական տարողության մեծացմանը: Այդ մասին է վկայում նաև մարզվող ուսանողների կրծքավանդակի շրջագծի ամպլիտուդի հավաստի մեծացումը, իսկ ստուգիչ խմբի դեպքում այն համարյա չի ավելանում: Ակնհայտ է դառնում, որ ֆիզիկական վարժանքների զուգակցումը շնչառական վարժությունների՝ մասնավորապես ՇՐԾԿՕՓ-ի հետ ավելի արդյունավետ է: Հայտնի է նաև, որ թոքերի տարբեր հատվածներում գազափոխանակության ինտենսիվությունը և արյան բաշխումը կախված է մարմնի դիրքից: Զափավոր ֆիզիկական ծանրաբեռնվածության ժամանակ թոքերի տարբեր հատվածների արյունամատակարարման տարբերությունը փոքրանում է, որը նախադրյալներ է ստեղծում գազափոխանակության բարելավման համար [5]: Այդ պատճառով էլ ֆիզիկական մարզումների զուգակցումը արտաքին շնչառության ինքնակամ օպտիմալացման և նրա հետագա ավտոմատացման հետ ավելի արդյունավետ է [4]:

Եռամսյա շնչառական մարզումներից հետո առաջին խմբի ուսանողների շնչառական բնական շարժումների թիվը հանգիստ վիճակում 1 րոպեում մոտավորապես 2-ով նվազում է, այսինքն՝ նկատվում է շնչառության նոր հաճախության ավտոմատացում, որը ենթադրում է շնչառության գործընթացի կենսախնայողություն:

Շնչառական յուրաքանչյուր շարժման ժամանակ որոշակի էներգիա է ծախսվում վերին շնչուղիների պատերի, որովայնի խոռոչի և կրծքավանդակի պատերի դիմադրությունը, թոքաբջջերի պատերի առաձգականության ուժը հաղթահարելու համար [3, 7, 8]: Բնականաբար շնչառական շարժումների թվի պակասելու դեպքում այդ էներգիայի մի մասը խնայվում է: Անշուշտ, այս խնայողությունը ծախսվում է օրգանիզմի հարմարվողական այլ մեխանիզմների գործարկման համար, բարձրացնելով նաև ֆիզիկական հնարավորությունները, որի բացահայտման նպատակով չափվել է հետազոտվողների դաստակների ուժը, որը ստուգիչ խմբի ուսանողների մոտ թույլ էր արտահայտված: Փորձարարական խմբում նկատվել է դաստակների ուժի հավաստի մեծացում: Փորձարարական և ստուգիչ խմբերի ուսանողների այս ցուցանիշի համեմատական վերլուծությունը ցույց է տալիս, որ շնչառական և ֆիզիկական վարժությունների զուգակցումն ավելի արդյունավետ է:

Հայտնի է, որ գլխուղեղի տարբեր հատվածներում գոյություն ունեն ուղիղ և խաչաձև կապեր երկու կիսագնդերի շնչառական և սիրտ-անոթային կարգավորման կենտրոնների միջև: Այդ համակարգերի միջև եղած կապերը գործում են ԿԼՀ-ի տարբեր մակարդակներում՝ կեղևի զգայական դաշտերից մինչև երկարավուն ուղեղի շնչառական և սիրտ-անոթային կենտրոններ: Այդ երկու ֆունկցիաների փոխկապակցված գործունեությունն իրականանում է ռեֆլեկտոր ճանապարհով: Սրտի և շնչառության ռիթմերի կապվածության աստիճանը կախված է օրգանիզմի ֆունկցիոնալ վիճակից, հուզական և ֆիզիկական լարվածությունից: Օրգանիզմը թթվածնով ապահովող նշված համակարգերի աշխատանքը մարդու հարմարվողական գործունեության ցուցանիշներն են: Մարզումների արդյունքում շնչառության հաճախության ավտոմատացումը հանգեցնում է սրտի հաճախության նորմալացման, որը օրգանիզմի ֆունկցիոնալ վիճակի կարգավորման գլխավոր գործոնն է՝ հատկապես սիրտ-անոթային խանգարումներ ունեցողների համար:

Գոյություն ունի դրական փոխկապակցվածություն շնչառության ռոպեական ծավալի, սրտի կծկումների հաճախության և արյան ռոպեական ծավալի, այսինքն՝ ֆիզիկական աշխատանքի ինտենսիվությունը բնութագրող չափանիշների միջև: Դա թույլ է տալիս ենթադրել, որ միևնույն տևողությամբ ֆիզիկական աշխատանք կատարելիս շնչառության ռոպեական ծավալի փոքրացումը ուղեկցվում է սրտի հաճախության փոքրացմամբ, ինչը նպաստում է նրա գործունեության խնայողությանը [4, 6]: Ստուգիչ խմբում այս ցուցանիշը էական փոփոխության չի ենթարկվում, ինչը մեկ անգամ ևս վկայում է ֆունկցիոնալ տարբեր խանգարումների ժամանակ շնչառության ռիթմի ինքնակամ փոքրացման մեթոդի բարձր արդյունավետության մասին: Այս հետազոտության արդյունքում պարզվեց, որ բոլոր ուսանողների մոտ լավացել է ինքնազգացողությունը, իսկ կիսամյակային ցուցանիշները փաստեցին, որ բարձրացել է նաև ուսման առաջադիմությունը:

Թթվածնային անբավարարությունը մեր կյանքի անբաժան ուղեկիցն է: Իսկ մեր հանրապետության աշխարհագրական բարձրավանդակային դիրքը (ծովի մակերևույթից միջինը 1000 մ բարձր) ապահովում է միջավայրի չափավոր թթվածնային անբավարարության որոշակի ֆոն, որն ավելի է դժվարացնում մարդկանց մոտ վերը նշված տարաբնույթ հրահրված թթվածնաբաղային իրավիճակը: Այդ անբավարարությունը կանխելու կամ մեղմացնելու լավագույն մեթոդ է շնչառության ռոպեական ծավալի ինքնակամ օպտիմալ փոքրացումը, որի ժամանակ շնչառական ուղիների մեռյալ տարածքի օդի ծավալի պակասեցման հաշվին ավելանում է շնչառական օդի ծավալը: Դա նշանակում է նվազ էներգետիկական ծախսումներով, այսինքն շնչառության խնայողությամբ հասնել օրգանիզմը թթվածնով ապահովելու առավելագույն արդյունքի:

Սակայն ինչպե՞ս է ստացվում, որ տարաբնույթ հիվանդությունները հնարավոր է հաղթահարել կամ թեթևացնել միևնույն մեթոդով: Դիտարկումները ցույց են տվել, որ էպոլոգիական և արտակարգ գործոնների (սթրեսներ, աղմուկ, ցուրտ, խավար) հետևանքով առաջացած տարբեր հիվանդությունների (սրտի ռիթմի խանգարումներ, ալերգիաներ, ասթմա, շաքարային դիաբետ և այլն) զարգացման մեջ մեծ դեր ունի թթվածնի անբավարարությունը [1, 2]:

Ընդ որում օրգանիզմի հյուսվածքներում այն զարգանում է միևնույն սխեմայով: Սկզբում փոփոխություններ են կատարվում համակարգերի մակարդակով՝ արտաքին անբարենպաստ ազդեցությունների հետևանքով ակտիվանում և զրգռվում են ընկալիչները, բարձրանում է սիմպաթիկ նյարդային համակարգի տոնուսը, ավելանում է կատեխոլամինների (ադրենալին, նորադրենալին) արտադրությունը, բարձրանում է կինինային և ռենինային հիպոտենզիվ (ճնշում իջեցնող) համակարգերի ակտիվությունը, տեղի է ունենում ծայրամասային անոթների սպազմ: Այնուհետև խանգարումներ են տեղի ունենում բջջային մակարդակում՝ նկատվում է էրիթրոցիտների, թրոմբոցիտների, նեյտրոֆիլների, մակրոֆագների քայքայում: Արյան մակարդեղիությունը բարձրանում է, տեղի է ունենում նրա բջիջների ագրեգացիա, մազանոթներում և արյան փոքր շրջանառության խանգարում, հյուսվածքներում թթվածնի քանակի նվազում, բջիջների այտուց, միտոքոնդրիումների քայքայում: Այնուհետև ախտաբանական գործընթացները շարունակվում են մոլեկուլային մակարդակում: Նկատվում են օքսիդացման և ֆոսֆորիլացման պրոցեսների խանգարումներ, մակրոերգիկ կապերի նվազում, Na-K-ական պոմպի գործունեության խանգարում, ազատ ռադիկալների առաջացման խթանում, անցում օքսիդացման անաերոբ եղանակի, մետաբոլիկ ացիդոզ, տոքսեմիա, հիպոերգիա: Այս բոլորից հետևում է, որ թթվածնային անբավարարությունը, անկախ դրա ծագումնաբանությունից, անխտիր հանգեցնում է բջիջներում, մասնավորապես ԿՆՅ-ում օքսիդացման պրոցեսների խանգարման, որը դանդաղեցնում է էներգետիկ կապերի առաջացումը՝ իջեցնելով բջիջի էներգետիկական ներուժը և ճնշելով պլաստիկ փոխանակության գործընթացները: Ընթացական վարժությունների շնորհիվ հնարավոր է դառնում բջիջներին թթվածնով ապահովելը, որն էլ նշված գործընթացների հակառակ ուղղությամբ բարելավում է օրգանիզմի ֆունկցիոնալ վիճակը:

Այսպիսով, շնչառության հաճախության ինքնակամ օպտիմալ փոքրացման մեթոդի կիրառումը բավական արդյունավետ է առողջական վիճակի բարելավման համար: Հարկ է նշել մի կարևոր հանգամանք. բացի այն, որ այս մեթոդը կիրառման առումով շատ մատչելի է, այն հետազոտվողից պահանջում է նաև կամային որոշակի դրսևորումներ (շնչառության բնականոն ռիթմը փոխելու համար՝ մեկ րոպեում 6 շնչառական շարժում 16-ի փոխարեն), որը պակաս կարևոր չէ երիտասարդների դաստիարակության գործում:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. Агаджанян Н.А., Гневушева В.Б., Катков А.Ю. Адаптация к гипоксии и биоэкономика внешнего дыхания. М., с.185, 1987.
2. Агаджанян Н.А., Полунин И.Н., Степанов В.К., Поляков В.Н. Человек в условиях гипоксии и гиперкапнии. Астрахань, М., с.340, 2001.
3. Григорян А.Ф., Акопян Н.С., Адамян Н.Ю., Арутюнян Р.С. Биоэкономика внешнего дыхания человека. Теория и практика физ. культуры, 8, с.58-61, 2003.
4. Сафонов В.А. Как дышим, так и живем. М. с.135, 2004.
5. Смирнов В.М. Физиология человека. М., с.250, 2003.
6. Сороко С.И., Родкина Т.П. Изменение центральных вегетативных механизмов регуляции при воздействии экспериментальной высокогорной гипоксии. Материалы симпозиума "Интеграция механизмов регуляции функций". Майкоп, с.77-78, 1996.
7. Bertges D.J., Fink M.P., Delude R.L. Hypoxic signal transduction in critical illness. Crit.Care Med., 28, p.78-86, 2000.
8. Tiinane S., Sulppo M., Seppanen T. Reducing the effect of respiration in baroreflex sensitivity estimation with adaptive filtering. IEEE Trans. Biomed. Eng., 55, 1, p.51-59, 2008.

Ստացվել է 10.02.2016



Биол. журн. Армении, 2 (68), 2016

БИОГИДРОМЕТАЛЛУРГИЧЕСКАЯ ПЕРЕРАБОТКА ХВОСТОВ ОБОГАЩЕНИЯ ПОЛИМЕТАЛЛИЧЕСКОЙ РУДЫ ШАУМЯНА С ЦЕЛЮ ИЗВЛЕЧЕНИЯ ЦЕННЫХ МЕТАЛЛОВ

Н.С. ВАРДАНЯН*, Г.Г. СЕВОЯН**, С.В. НАВАСАРДЯН***,
А.К. ВАРДАНЯН*, Т.С. НАВАСАРДЯН***

* НПОЦ "Армбиотехнология" НАН РА,
nvard@sci.am

** Национальный политехнический университет Армении,

*** ЗАО "Dundee Precious Metals Kapan", 3301 Капан, ул. Горцаранаин 4.

Изучались возможности биогидрометаллургического извлечения ценных металлов из образцов хвостов обогащения полиметаллической руды из Шаумянского рудника (Капан). Для выщелачивания хвостов использовали выделенную нами коллекционную культуру железо- и сероокисляющих бактерий *Acidithiobacillus* sp. 13Zn, а также природный консорциум выщелачивающих бактерий рудничной воды (Каварт). Показано, что испытанные пробы хвостов являются вполне пригодными и удобными объектами для биовыщелачивания. Выщелачивание образцов хвостов можно осуществить с применением природного консорциума рудничной воды. Для интенсификации процессов извлечения ценных металлов можно совместно с природным консорциумом выщелачивающих бактерий применять культуру железо- и сероокисляющей бактерии *Acidithiobacillus* sp. 13Zn.

*Хвосты флотационного обогащения – биогидрометаллургическая переработка –
извлечение цветных и благородных металлов*

Ուսումնասիրվել են Շահումյանի (Կապան) բազմամետաղային հանքաքարի հարստացման արդյունքում առաջացած պղնձների նմուշներից արժեքավոր մետաղների կորզման հնարավորությունները: Պղնձների կենսատարրալուծման համար օգտագործվել է մեր կողմից նախկինում մեկուսացված երկաթ և ծծումբ օքսիդացնող *Acidithiobacillus* sp. 13Zn-ի կուլտուրան, ինչպես նաև Կավարտի բովանգաքարի տարրալուծող բակտերիաների բնական կոնսորցիումը: Ցույց է տրվել, որ փորձարկված պղնձների նմուշները պիտանի և հարմար են կենսատարրալուծման եղանակով արժեքավոր մետաղների կորզման համար: Պղնձների նմուշների կենսատարրալուծումը կարելի է հաջողությամբ իրականացնել կիրառելով Կավարտի բովանգաքարի բնական կոնսորցիում: Արժեքավոր մետաղների կորզման ինտենսիվությունը բարձրացնելու նպատակով բնական կոնսորցիումի հետ համատեղ կարելի է կիրառել երկաթ և ծծումբ օքսիդացնող բակտերիաների *Acidithiobacillus* sp. 13Zn կուլտուրան:

*Ֆլոտացիոն հարստացման պղնձներ – կենսահիդրոմետալուրգիական մշակում –
գունավոր և թանկարժեք մետաղների կորզում*

The possibilities for the recovery of valuable metals from the samples of tailings obtained from the beneficiation of Shahumyan (Kapan) polymetallic ore were studied. Previously isolated iron and sulphur oxidizing *Acidithiobacillus* sp. 13Zn, as well as natural consortium of leaching bacteria of Kavart drainage water were used for bioleaching of tailings. It was shown that the samples of tailings used were applicable and suitable for recovery of valuable metals by bioleaching. Bioleaching of the samples of tailings can be successfully performed using natural

consortium of Kavart drainage water. To increase the intensity of the recovery of valuable metals, the iron and sulphur oxidizing bacteria of *Acidithiobacillus* sp. 13Zn combined with natural consortium can be applied.

*Enrichment flotation tailings – biohydrometallurgical processing –
extraction of non-ferrous and precious metals*

Развитие горнодобывающей промышленности приводит к серьезным экологическим проблемам, связанным с накоплением огромных масс техногенных отходов, в том числе хвостов. Однако эти отходы содержат определенные количества ценных металлов, которые можно эффективно извлечь гидрометаллургическими методами. Важными преимуществами микробиологического выщелачивания являются его экономичность, высокая эффективность и исключительная безопасность для окружающей среды [10, 11].

Возникает проблема рационального природопользования, поскольку под складирование хвостов выведены из землепользования значительные площади.

Вышеупомянутые проблемы актуальны также для Армении, где сотни гектаров земли в разных регионах покрыты огромными массами хвостов и других металлургических отходов. Разработка эффективной интегрированной технологии для переработки этих хвостов с целью извлечения цветных и драгоценных металлов весьма актуальна.

В практике биоокисления применяется для переработки золотоносных руд, в которых золото находится в кристаллической решетке сульфидных минералов, таких как пирит (FeS_2) и арсенопирит (FeAsS). Следует отметить, что арсенопиритные руды считаются наиболее удобными объектами для биоокисления, тогда как пирит является трудноокисляемым минералом и соответственно золотосодержащие пиритные руды относятся к упорным рудам [2, 13].

Эффективность процесса биоокисления во многом обусловлена активностью используемых микроорганизмов. Биогидрометаллургическая переработка золотосодержащих арсенопиритных руд в основном осуществляется с помощью мезофильных железо- и сероокисляющих бактерий *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* и *Leptospirillum ferrooxidans* [7, 8, 9, 14]. Однако в последнее время возрос интерес к термофильным или термотолерантным микроорганизмам, которые обладают более высокой окислительной активностью и могут выдерживать высокие температуры в пульпе, вызванные окислением сульфидных минералов [4, 14, 16, 18]. Вместе с тем установлена высокая эффективность консорциумов термотолерантных железо- и сероокисляющих бактерий родов *Sulfobacillus*, *Leptospirillum*, *Acidithiobacillus* и *Acidimicrobium* в биоокислении сульфидных минералов [1, 2, 4, 5, 12, 17, 19].

Целью нашего исследования являлось изучение возможностей эффективно-го извлечения ценных компонентов из хвостов флотационного обогащения цинкового концентрата с помощью железо- и сероокисляющих бактерий. Учитывая специфический состав хвостов, в частности, превалирование пирита над другими минералами, для их переработки предлагается использовать термотолерантные бактерии и их консорциумы. Эти бактерии могут успешно применяться как для выщелачивания и биоокисления хвостов, так и для регенерации биорастворов, являющихся сильными окислителями для сульфидных минералов [3, 6, 20].

Материал и методика. Объектом для биовыщелачивания служили условно обозначенные пробы M1705 (pH 5.0), M1703 (pH 7.0), M1701 (pH 9.0) и M1699 (pH 11.8) концентрированных хвостов Капанской горно-обогатительной фабрики ЗАО «Dundee Precious Metals Kapan». Химический состав проб хвостов представлен в табл.1.

Таблица 1. Химический состав проб обогащенных хвостов

Пробы	Содержание, %						
	Au, г/т	Cu	Pb	Zn	Fe	Cd	S
M1699	4.45	0.201	0.04	0.7	40.49	49.26	37.4
M1701	4.26	0.194	0.063	0.598	39.015	39.409	37.980
M1703	4.30	0.295	0.047	0.748	43.202	49.261	36.540
M1705	5.42	0.408	0.074	1.157	41.62	78.43	38.64

Для выщелачивания проб хвостов использовали выделенную нами ранее железо- и сероокисляющую бактерию *Acidithiobacillus* sp. 13Zn [15, 21], а также рудничную воду Каварта (Капан). Перед использованием pH рудничной воды установили pH 2.0 с помощью 10 N H₂SO₄. Выщелачивание осуществлялось в 250-миллиметровых колбах, содержащих 50 мл среды 9К [1] или рудничной воды, измельченных концентратов (от 10 до 20 %) и железоокисляющей бактерии *Acidithiobacillus* 13Zn в количестве 10⁷–10⁸ кл/мл. При использовании рудничной воды выщелачивающим агентом являлся природный консорциум железо- и сероокисляющих бактерий.

Опыты проводили в периодическом режиме культивирования на качалке (180-240 об/мин) при 30-37°C. Плотность пульпы (ПП) рассчитывали как соотношение массы минерала к объему выщелачивающего раствора.

Об интенсивности выщелачивания проб хвостов судили по количеству металлов, перешедших в раствор, а также по снижению pH раствора (образованию серной кислоты). Периодически с интервалом 48 или 72 ч брали пробы для физико-химических и микробиологических анализов. Опыты проводили в трехкратной повторности. Данные экспериментов обработаны статистически.

Результаты и обсуждение. Динамика выщелачивания проб M1705, M1703, M1701 и M1699 концентрированных хвостов с использованием среды 9К и железо- и сероокисляющих бактерий *Acidithiobacillus* sp.13Zn приведена на рис. 1. Как показывают представленные данные, применение его позволило увеличить выщелачивание железа из проб в среднем 15-20 раз по сравнению с химическим контролем (рис.1а). При этом выщелачивание железа из проб M1703, M1701 и M1699 протекало почти с одинаковой эффективностью, тогда как количество выщелоченного железа из пробы M1705 было значительно ниже.

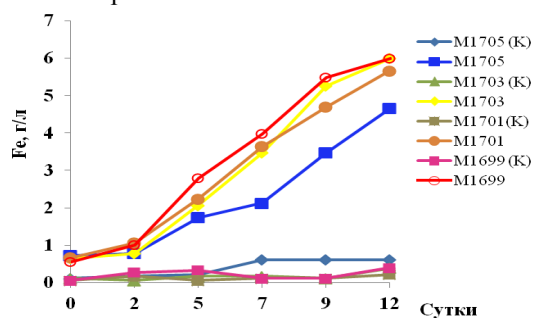


Рис.1.а Динамика выщелачивания железа из проб хвостов M1699, M1701, M1703 и M1705 с помощью *Acidithiobacillus* sp.13Zn (среда 9К, ПП- 10%, pH=2,0, t=35, 180об/мин) M1699 (К), M1701 (К), M1703 (К) и M1705 (К)- химическое выщелачивание (контроль без бактерии)

Извлечение меди при выщелачивании проб M1703, M1701 и M1699 с использованием *Acidithiobacillus* sp.13 возрастало в 4-5 раз, а в случае пробы M1705 в 2,3 раза (рис. 1б). Ниже представлены результаты выщелачивания железа и меди из проб концен трированных хвостов с применением рудничной воды Каварта (рис. 2).

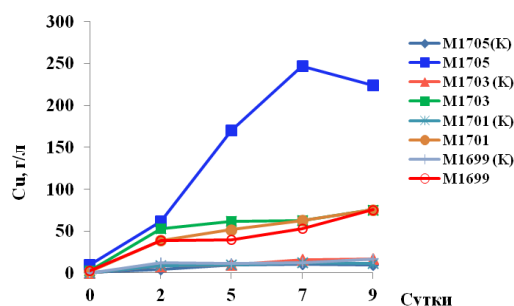


Рис.1.б. Динамика выщелачивания меди из проб хвостов M1699, M1701, M1703 и M1705 с помощью *Acidithiobacillus* sp.13Zn (среда 9К, ПП-10%, pH=2,0, t=35, 180об/мин) M1699 (K), M1701 (K), M1703 (K) и M1705 (K)- химическое выщелачивание (контроль без бактерий)

Согласно представленным данным, количество выщелоченного с помощью рудничной воды железа и меди соответственно в 2-2.5 и 1.5 раза уступает таковым на эксперименте с использованием *Acidithiobacillus* sp. 13Zn. Это можно объяснить низким титром выщелачивающих бактерий (10^4 кл/мл), обнаруженных в рудничной воде из-за недостаточного количества в ней элементов, необходимых для роста бактерий.

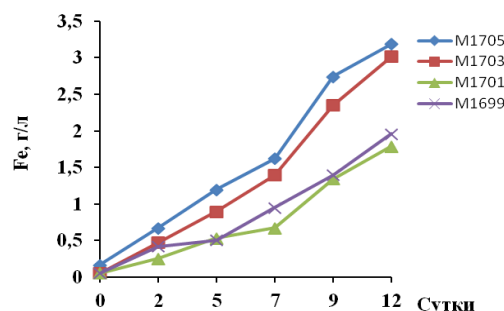


Рис. 2 а. Выщелачивание железа из проб M1699, M1701, M1703 и M1705 хвостов с помощью природной ассоциации выщелачивающих бактерий (рудничная вода Каварта, ПП – 10 %, pH 2,0, t 35, 180 об/ мин) M1699 (K), M1701 (K), M1703 (K) и M1705 (K)- химическое выщелачивание (контроль без бактерий)

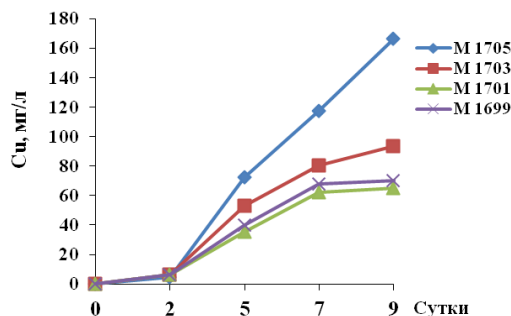


Рис. 2 б. Выщелачивание меди из проб M1699, M1701, M1703 и M1705 с помощью природной ассоциации выщелачивающих бактерий (рудничная вода Каварта, ПП – 10 %, pH 2,0, t 35, 180 об/ мин) M1699 (K), M1701 (K), M1703 (K) и M1705 (K)- химическое выщелачивание (контроль без бактерий)

На рис. 3 представлены результаты микробиологического выщелачивания проб M1705 и M1699 концентрированных хвостов при более высоких плотностях пульпы (ПП) – 15 и 20%. В целом выщелачивание железа из проб M1705 и M1699 за 12 сут составляло 11.5–12 % и 10 % соответственно при 15 %-ной ПП. При 20 %-ной ПП степень выщелачивания железа значительно ниже – 7–8 %. При этом извлечение меди из проб M1705 и M1699 составляло 33.3 % и 34 – 40 % соответственно (36).

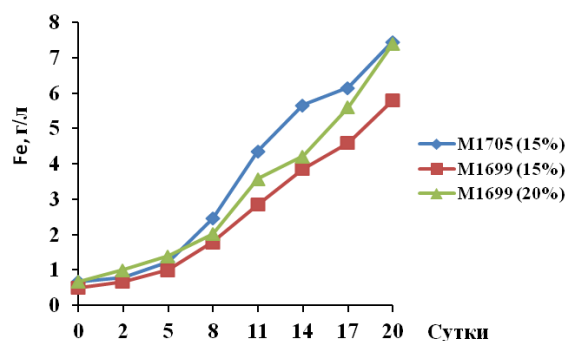


Рис. 3а. Экстракция железа из проб M1699 и M1705 с помощью природной ассоциации железоз- и сероокисляющих бактерий (рудничная вода Каварта, ПП -15, pH 2,0, t 35, и 20 %, 180 об /мин)

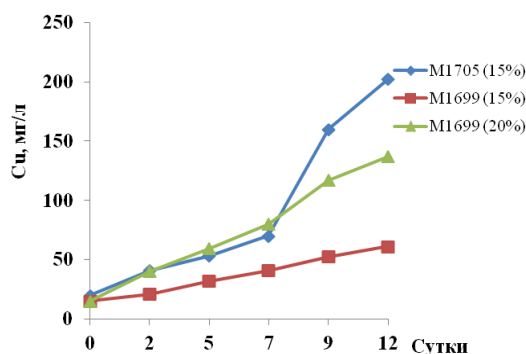


Рис.3 б. Экстракция меди из проб M1699 и M1705 с помощью природной ассоциации выщелачивающих бактерий (рудничная вода Каварта, ПП - 15% и 20%, pH = 2,0, t-35, 180 об/ мин)

Таким образом, можно заключить, что испытанные пробы концентрированных хвостов являются удобными объектами для биовыщелачивания. При этом биовыщелачивание можно осуществить природной ассоциацией выщелачивающих бактерий с использованием рудничной воды Каварта. Для интенсификации процесса биовыщелачивания хвостов можно применять *Acidithiobacillus* sp. 13Zn с природной ассоциацией выщелачивающих бактерий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Биоготехнология металлов. Под ред. Каравайко Г.И., Росси Дж., Агате А., Грудева С., Авакян З.А., М., Центр международных проектов ГКНТ, 1989. 375с.

2. Меламуд В.С., Пивоварова Т.А., Кондратьева Т.Ф., Каравайко Г.И. Изучение процесса бактериального окисления золотосодержащего пиритно-арсенопиритного концентрата в умеренно термофильных условиях. Прикл. биохимия и микробиология, 35, 2, с. 182-189, 1999.
3. Das T., Chaudhury G.R. Iron Oxidation Studies with Immobilized Cells of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. J. Scientific Industrial Research. 65, p. 594-598. 2006.
4. Dopson M., Lindstrom E.B. Analysis of Community during Moderately thermophilic Bioleaching of Pyrite, Arsenical Pyrite and Chalcopyrite. Microbial Ecology. 48, 1, p. 19 – 28, 2004.
5. Dopson M., Lindstrom E.B. Potential role of *Thiobacillus caldus* in Arsenopyrite Leaching. Appl. Environ Microbiol., 65, 1, p. 36-40. 1999.
6. Ginsburg M.A., Penev K., Karamanev D. Immobilization and Ferrous Iron Biooxidation Studies of a *Leptospirillum* sp. Mixed-cell Culture. Mineral Engineering. 22, 2, p.140-148, 2009.
7. Goebel B.M., Stackebrandt E. Cultural and phylogenetic analysis of mixed microbial populations found in natural and commercial bioleaching environments. Appl. Environ. Microbiol., 60, 5, p. 1614-1621, 1994.
8. Johnson D.B., Roberto F.F. Biodiversity of acidophilic bacteria in mineral leaching and related environments, abstr. no. P3. 1-10. In IBS Biomine '97 Conference Proceedings. Australian Mineral Foundation, Glenside, Australia, 1997.
9. Okibe N., Gericke M., Hallberg K.B., Johnson B.D. Enumeration and Characterization of Acidophilic Microorganisms Isolated from a Pilot Plant Stirred-Tank Bioleaching Operation. Appl. Microbiol., 69, 4, p. 1936-1943, 2003.
10. Olson G.J., Brierley J.A., Brierley C.L. Bioleaching review part B: Progress in bioleaching: applications of microbial processes by the mineral industries. Appl. Microbiol. Biotechnol., 63, p. 249-257, 2003.
11. Rawlings D.E. Heavy metal mining using microbes. Ann. Rev. Microbiol., 56, p. 65-91, 2002.
12. Rawlings D.E., Coram N.J., Gardner M.N., Deane S.M. *Thiobacillus caldus* and *Leptospirillum ferrooxidans* are widely distributed in continuous flow biooxidation tanks used to treat a variety of metal containing ores and concentrates. In: R. Amils and A. Ballester (eds.), Biohydrometallurgy and Environment: Toward the Mining of the 21st Century. Part A. - Elsevier, Amsterdam, the Netherlands, 1999.
13. Rawlings D.E., Tributsch H., Hansford G.S. Reasons why '*Leptospirillum*'-like species rather than *Thiobacillus ferrooxidans* are the dominant iron-oxidizing bacteria in many commercial processes for the biooxidation of pyrite and related ores. Microbiology, 145, p.5-13. 1999.
14. Sand W., Rohde K., Sobotke B., Zenneck C. Evolution of *Leptospirillum ferrooxidans* for leaching. Appl. Environ. Microbiol., 58, 1, p.85-92, 1992.
15. Stepanyan S.Kh., Vardanyan A.K., Vardanyan, N.S. Biooxidation of pyrite, sulfide ore and copper concentrate by new isolated sulfur and/or iron oxidizing bacteria. Biolog. Journal of Armenia, 68, 1, p. 6-10. 2016.
16. Vardanyan N.S. Oxidation of Pyrite and Chalcopyrite by Mixed Cultures of Sulfobacilli and Ferrous and Sulphur Oxidizing Bacteria. Biotechnology, 6, p. 79-83, 2003.
17. Vardanyan N.S., Akopyan V.P. *Leptospirillum*-like Bacteria and Evaluation of their Role in Pyrite Oxidation. Microbiology, 72, 4, p. 493-497, 2003.
18. Vardanyan A.K., Markosyan L.S., Vardanyan N.S. Immobilization of new isolated iron oxidizing bacteria on natural carriers. Advanced Materials Research, 825, p. 388-391, 2013.
19. Vardanyan N.S., Markosyan L.S., Naghdalyan S.Z. Characteristics of periodic process of leaching of refractory gold containing ores by *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* subsp. *Asporogenes*. Biolog. Journal of Armenia, 59, 1-2, p.78-83. 2007.
20. Vardanyan N.S., Naghdalyan S.Z. Periodic Bioleaching of Refractory Gold-Bearing Pyrite Ore. Applied Biochemistry and Microbiology, 45, 4, p. 446-451. 2009.
21. Vardanyan A.K., Stepanyan S.Kh, Vardanyan N.S, Markosyan L.S, Sand W., Vera M., Zhang R. Study and assessment of microbial communities in natural and commercial bioleaching system. Minerals Engineering., 81, p. 167-172. 2015.

Поступила 20.02.2016