



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

2017

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, Ս.Ա. Դավթյան, Ժ.Ի. Հակոբյան, Վ.Պ. Հակոբյան,
Ս.Հ. Մովսիսյան, 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, Լ.Ր. Մանվելյան, Ս.Խ. Մայրապետյան, Ժ.Հ. Վարդանյան

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Յու.Տ. Ալեքսանյան, Մ.Ա. Դավթյան, Ժ.Ի. Հակոբյան, Վ.Պ. Հակոբյան,
Ս.Հ. Մովսեսյան, Գ.Ա. Փանոսյան, Լ.Լ. Օսիպյան

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, M.A. Davtyan, Zh.I. Hakobyan, V.P. Hakobyan,
S.H. Movsesyan, G.H. Panosyan, L.L. Osipyan

© Հայաստանի Կենսաբանական Հանդես, 2017
© Биологический Журнал Армении, 2017
© Biological Journal of Armenia, 2017

ԲՈՎԱՆԴԱԿՈՒԹՅՈՒՆ

•Փորձարարական և տեսական հոդվածներ•

Մարության Ս.Վ., Պետրոսյան Գ.Հ., Մարության Ս.Ա., Նավասարդյան Լ.Հ. Միլիմետրական և դեցիմետրական տիրույթների ճառագայթահարման ազդեցությունը պուրինային նուկլեոտիդների դեգամինացման վրա <i>c. guilliermondii</i> НП-4 խմորասնկային բջիջներում	6
Մարգարյան Է.Յու. Միկոգների էթիոլոգիական կենսաբազմազանությունը	10
Айрапетян Н., Агаджанян А., Хачатрян М., Трчунян А. Влияние иммобилизационного стресса на некоторые биохимические показатели углеводного обмена в сыворотке крови кроликов	13
Акопян А.М., Агабабова А. А. Транслокация микроорганизмов при опухолевых процессах	18
Алчуджян Н.Х., Агабабова А.А., Мовсесян Н.О., Оганнисян М.Р., Акопян А.М., Мовсесян О.А., Геворкян Г.А. Модулирующее влияние коктейля селективных штаммов пробиотиков на внутриклеточные метаболические сдвиги в динамике дексамфетамин-индуцированного биполярного расстройства	23
Габриелян Л.С. Влияние режима освещения на выделение водорода фототрофными организмами	30
Григорян К.М., Саргсян М.П. Влияние видов рода <i>pseudomonas spp.</i> На микробиологическое качество и безопасность переработанной аквакультуры форели в производственных условиях	35
Гюрджян К.Г., Давтян М.П., Григорян Р., Саркисян Н. Возможность использования фукозоспецифического лектина для детекции новообразований	39
Захарян А.А. Активность ферментов биосинтеза пролина и их внутриклеточная локализация в различных органах радужной форели <i>parasalmo mikiss</i>	43
Маргарян А.С., Бадалян Р.Б., Симонян А.А., Симонян Р.А. Регулирующий эффект SKQ1 на активность MG2+-Атфазы в митохондриях различных органов крыс при коразол-индуцированных эпилептиформных припадках	46
Маргарян С., Мартиртосян А., Карабон Л., Виткович А., Манукян Г. Влияние sfasl на уровни окислительного стресса в клетках врожденного иммунитета больных сахарным диабетом второго типа	50
Овсепян В.В., Григорян К.М. Микобиота культуры красного перца на разных стадиях вегетации и обработки	54
Саргсян Т.А., Навасардян М.А., Межунц Б.Х. Исследование фотосинтетических пигментов травяных растений горы Арагац	58
Семерджян Г.Г., Семерджян Г.А. Использование ферментов обмена пуриновых оснований для мониторинга загрязнения окружающей среды	63
Тароян С.К., Варданян А.Г., Хачатрян Р.С., Камалян Р.Г. Влияние совместного применения гамк и бентонита на содержание нейроактивных аминокислот в органах и глюкозы в крови крыс при экспериментальном аллоксановом диабете	67
Тоноян Л.А. Влияние длины алкильной цепи поверхностно активных веществ на устойчивость бислоистой липидной мембраны	70

<i>Хачатрян Л.Р., Нерсисян Г.С., Навасардян М.А., Саргсян Т.А., Межуниц Б.Х., Оганесян А.А.</i> Изучение физиолого-биохимических показателей листьев деревьев в зеленых зонах города Еревана	74
<i>Цаканян А.В., Алексанян Ю.Т., Мелик-Андреасян Г.Г., Ханджян Г.Ж., Андреасян Н.А., Азатян А.Б.</i> Антибиотокочувствительность микроорганизмов, выделенных из молочных продуктов	81
<i>Тумасян Э. А.</i> Квантовый переход как механизм биологического процесса <i>in vivo</i>	85
<i>Antonyan A.A., Karapetyan L.G., Sharoyan S.G., Mardanyan S.S.</i> Isoforms of adenosine deaminase1 in synovial fluids at different arthritis	92
<i>Babayan A., Petrosyan M., Sahakyan N., Trchounian A.</i> The radical scavenging activity of some species of artemisia genus, represented in armenian flora	96
<i>Danielyan K.E., Simonyan A.A., Chailyan S.G.</i> Behavior of two purine and pyrimidine metabolism related key regulative enzymes in normal and pathological conditions .	100
<i>Ginosyan S. V., Grabski H. V., Tiratsuyan S. G.</i> Insights on glucocorticoid receptor modulation through binding of artemisinin	104
<i>Hakobyan L.Y., Gabrielyan L.S., A.H. Trchounian</i> Bio-hydrogen production by <i>rhodobactersphaeroides</i> during mixedcarbon fermentation	110
<i>Hakobyan L.L., Grigoryan K.M., Trchounian A.H.</i> The content of sulfur dioxide in dried vine fruit realised in Armenia	113
<i>Harutyunyan H.S., Shaljian A.L., Saharyan A.V., Alaverdyan H.R., Vardanyan G.S., Aghajanyan M.I.</i> The possible role of serotonin and adenosine at different origin noxious stimuli information realization	118
<i>Javrushyan H., Avtandilyan N., Mamikonyan A., Trchounian A.</i> The change of polyamines and nitric oxide quantities in human blood serum of prostate and bladder cancer ..	125
<i>Karapetyan H., Barseghyan E., Trchounian A.</i> Antioxidant properties of stevia (<i>stevia rebaudiana bertonii</i>) during immobilization stress	133
<i>Martirosyan A.</i> 17 β -estradiol attenuates the LPS-induced inflammatory response in whole blood cells culture	137
<i>Manukyan A.L.</i> Chronic acoustic stress and α_2 -adrenoblockers effect on open field activity of the rat	141
<i>Melkumyan I.E., Hovhannisyan R.S.,</i> Biotechnology of citric acid production from topinambur	148
<i>Poladyan A.A.</i> New approaches to enhance hydrogen production from glycerol by <i>Escherichia coli</i>	153
<i>Sarukhanyan F. P., Hovhannisyan G. A., Hunanyan O. V., Zakaryan H. H., Barkhudaryan N. H.</i> The study of calcineurin activity in pathophysiology of ovarian cancer .	159
<i>Semerjyan I., Petrosyan M., Sahakyan N., Trchounian A.</i> <i>Crupina vulgaris</i> cass. <i>in vitro</i> culture obtaining	163
<i>Zakaryan H.H., Sarukhanyan F.P., Hovhannisyan G.A., Barkhudaryan N.H.</i> The study of the changes in activity of SOD in pathophysiology of gastric cancer depending on the stage of disease	166



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 1(69), 2017

**ՄԻԼԻՄԵՏՐԱԿԱՆ և ԴԵՑԻՄԵՏՐԱԿԱՆ ՏԻՐՈՒՅԹՆԵՐԻ ԾԱՌԱԳԱՅԹԱՅԱՐՄԱՆ
ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՊՈՒՐԻՆԱՑԻՆ ՆՈՒԿԼԵՈՏԻՂՆԵՐԻ ԴԵԶԱՄԻՆԱՑՄԱՆ ՎՐԱ C.
guilliermondii НП-4 ԽՄՈՐԱՍՆԿԱՅԻՆ ԲՋԻՋՆԵՐՈՒՄ**

**ՄԱՐՈՒԹՅԱՆ Ս.Վ., ՊԵՏՐՈՍՅԱՆ Գ.Յ., ՄԱՐՈՒԹՅԱՆ Ս.Ա.,
ՆԱՎԱՍԱՐԴՅԱՆ Լ.Յ.**

*Երևանի պետական համալսարան, կենսաքիմիայի, մանրէաբանության և
կենսատեխնոլոգիայի ամբիոն*

Իրականացվել է *C.guilliermondii* НП-4 խմորասնկային բջիջներում պուրինային միացությունների դեզամինացման ուսումնասիրություններ խմորասնկային բջիջները միլիմետրական և դեցիմետրական տիրույթի ոչիոնացնող ճառագայթներով ճառագայթահարելուց և հետճառագայթային ռեպարացիայից հետո: Դրսևորվել են դեզամինացման ուժգնության փոփոխություններ պոլիֆոսֆատ-նուկլեոտիդների՝ ԱԿՖ-ի, ԱԵՖ-ի, ԳԿՖ-ի և ԳԵՖ-ի դեպքում, ինչը, հավանաբար, պայմանավորված է էքստրեմալ վիճակում ներբջջային պոլիֆոսֆատների մետաբոլիզմի ինտենսիվության փոփոխությամբ:
Միլիմետրական ալիքներ, դեցիմետրական ալիքներ, նուկլեոտիդներ, դեզամինացում

Осуществлено исследование дезаминирования пуриновых нуклеотидов в дрожжевых клетках *C.guilliermondii* НП-4, облученных в областях миллиметровых и дециметровых длин волн и после пострadiационной репарации. Были обнаружены изменения в интенсивности дезаминирования полифосфат-нуклеотидов АДФ, АТФ, ГДФ и ГТФ, что, по всей вероятности, обусловлено изменением интенсивности метаболизма полифосфатов клеток в экстремальных условиях.

миллиметровые волны, дециметровые волны, нуклеотиды, дезаминирование

The investigation of purinenucleotides deamination in yeast cells *C.guilliermondii* NP-4 irradiated by millimeter and decimeter ranges of waves and after postradiation repair was realized. It has been shown that the changes in deamination intensity of polyphosphate-nucleotides ADP, ATP, GDP and GTP take place which perhaps can be conditioned with changes of metabolism of polyphosphate-nucleotides in cells in extreme conditions.

millimeter waves, decimeter waves, nucleotides, deamination

Ներկայումս, կապված շրջապատող միջավայրի աղտոտվածության մեծացման հետ, արդիական խնդիր է դարձել կենդանի օրգանիզմների վրա արտաքին միջավայրի անբարենպաստ ազդակների ազդեցության մոլեկուլային մեխանիզմների բացահայտումը: Մարդու գործունեության ոլորտների ընդլայնմանը զուգահեռ, կապված գիտատեխնիկական առաջընթացի, հատկապես՝ բջջային հեռախոսակապի (միլիմետրական տիրույթի ալիքներ) և անթել համացանցի՝ Wi-Fi-ի (դեցիմետրական տիրույթի ալիքներ) օգտագործման հետ, մեծանում է կենդանի օրգանիզմների վրա երկարալիք ճառագայթման ազդեցությունը: Բջջային հեռախոսների օգտագործումը վտանգավոր հետևանքներ ունի մարդու առողջության համար՝ ընդհուպ մինչև գլխուղեղի և սեռական համակարգի տարբեր հիվանդությունների, այդ թվում՝ նաև քաղցկեղի զարգացումը [2, 4], երկարալիք տիրույթի ալիքների ազդեցությամբ նկատվում են բջիջների թաղանթներում Na-K-ական անցքողիների ակտիվության փոփոխություններ, ինչպես նաև՝ դիտվում է զգալի ջերմային ազդեցություն բջիջների վրա [7]: Կենդանի օրգանիզմներն օժտված են հարմարվողական մեծ

հնարավորություններով, որոնք թույլ են տալիս նրանց վերապրել էքստրեմալ պայմաններում: Այդ ընթացքում օրգանիզմների բջիջներում սկսում են գործել որոշակի պաշտպանական մեխանիզմներ, որոնք կապված են նոր սպիտակուցների սինթեզի և մետաբոլիկ փոփոխությունների դրսևորման հետ: Այս տեսակետից կարևոր է ծայրահեղ պայմաններում ստորակարգ էուկարիոտների, մասնավորապես՝ խմորասկային բջիջների ժառանգական նյութի [3], *ԴՆԹ*-ի կառուցվածքային մոնոմերներ հանդիսացող նուկլեոտիդների փոխանակության, ինչպես նաև՝ խմորասկային սպիտակուցների կառուցվածքային և ֆունկցիոնալ փոփոխությունների ուսումնասիրումը [1], որը կարևոր ինֆորմացիա է տալիս բարձրակարգ էուկարիոտօրգանիզմներում էքստրեմալ պայմաններում դրսևորվող փոփոխությունների մասին:

Մեր աշխատանքի նպատակն է եղել՝ ուսումնասիրել պուրինային ազոտային հիմքերի, նուկլեոզիդների և նուկլեոտիդների դեգամինացումը *C. guilliermondii* HՄ-4 խմորասկային բջիջները միլիմետրական և դեցիմետրական ալիքներով ճառագայթահարելիս և բջիջների հետճառագայթային ռեպարացիայից հետո:

Նյութ և մեթոդ

Դետագոտության օբյեկտ են հանդիսացել *C. guilliermondii* HՄ-4 խմորասկային բջիջներն աճեցվել են հեղուկ սինթետիկ սննդամիջավայրում [1], թափահարող սարքի վրա: Խմորասկային կենսազանգվածը կուլտուրալ միջավայրից առանձնացվել է ցենտրիֆուգման միջոցով՝ 5000g արագությամբ, 10 րոպե տևողությամբ: Խմորասկային բջիջները թորած ջրով լվանալուց հետո որոշվել է թաց կենսազանգվածի կշիռը:

***C. guilliermondii* HՄ-4 խմորասկային բջիջների ճառագայթահարումը** - Խմորասկային աճի ստացիոնար փուլում կենսազանգվածի մի մասը ենթարկվել է ճառագայթահարման միլիմետրական ($\lambda=6$ մմ, $\nu=51.8$ ՄՀց) և դեցիմետրական ($\lambda=30$ սմ, $\nu=1$ ԳՀց) ալիքներով, սենյակային ջերմաստիճանում, 45 րոպե տևողությամբ:

Խմորասկային բջիջների հետճառագայթային վերականգնումը - ճառագայթահարված խմորասկային կենսազանգվածի մի մասը ենթարկվել է հետագա ինկուբացիայի՝ բջիջների վերականգնմանը նպաստող պայմաններում (30°C ջերմաստիճան, 100մՄ գլյուկոզի առկայություն), որում աճեցվել էր խմորասկային կենսազանգվածը նախքան ճառագայթահարելը:

Ջրալուծ սպիտակուցային էքստրակտի ստացումը խմորասկային բջիջներից - Խմորասկային բջիջները մինչև -10°C սառեցնելուց հետո մամլվել են նախապես սառեցված մամլիչով: Մամլումից հետո ստացված բջջային հոմոգենատը խառնվել է մազնիսական խառնիչի վրա, 20 րոպե տևողությամբ, թորած ջրի միջավայրում՝ ջրալուծ սպիտակուցներ պարունակող էքստրակտ ստանալու նպատակով: Ստացված հոմոգենատը ցենտրիֆուգվել է 25000g պայմաններում, 20ր տևողությամբ: Վերնստվածքում պարունակվում է խմորասկային սպիտակուցների ջրալուծ ֆրակցիան:

Դեգամինացման ընթացքում անջատված ամոնիակի քանակությունը որոշվել է Բերտոլդի գունային ֆենոլի ռեակցիայի մեթոդով [Martinek R.G., 1963]:

Արդյունքներ և քննարկում

Աշխատանքի առաջին փուլում իրականացվել է պուրինային նուկլեոտիդների (ԱԵՖ, ԱԿՖ, ԱՄՖ, ԳԵՖ, ԳԿՖ և ԳՄՖ), ինչպես նաև՝ նուկլեոզիդների (ադենոզին, գուանոզին) և ազոտային հիմքերի (ադենին և գուանին) դեգամինացման ուսումնասիրում միլիմետրական ալիքներով ճառագայթահարված և հետճառագայթային ռեպարացիայի ենթարկված *Candida guilliermondii* HՄ-4 խմորասկային բջիջներում:

Ազոտային հիմքերի և նուկլեոզիդների դեգամինացման ուժգնության վերաբերյալ մեր կողմից ստացված տվյալներից պարզվել է, որ ադենինդեգամինազ, ադենոզինդեգամինազ, գուանին դեգամինազ և գուանոզին դեգամինազ ֆերմենտները ակտիվություն չեն ցուցաբերում ոչ ճառագայթահարված, ոչ էլ՝ միլիմետրական տիրույթի ալիքներով ճառագայթահարված և ռեպարացված խմորասկային բջիջներում: Դեգամինացում չի դրսևորվել նաև ԳՄՖ-ի դեպքում: Պուրինային նուկլեոտիդների դեգամինացման վերաբերյալ ստաց-

ված տվյալները ներկայացված են աղյուսակ 1-ում: Չճառագայթահարված խմորասնկային բջիջներում բավական ցածր է եղել ԱՄՖ-ի և ԱԵՖ-ի դեզամինացման ուժգնությունը՝ դրսևորվել է համապատասխան ֆերմենտների հետքային ակտիվություն: Որոշակի ակտիվություն դիտվել է միայն ԱԿՖ-ի դեզամինացման գործընթացում: ԳԵՖ-ի և ԳԿՖ-ի դեզամինացման ուժգնության տեսակետից տարբերությունները աննշան են, և 1.7-2 անգամ ցածր են ԱԿՖ-ի համեմատությամբ:

Միլիմետրական ալիքներով ճառագայթահարման ենթարկված *Candida guilliermondii* HП-4 խմորասնկերում նկատվում է ԱԿՖ-ի և ԳԿՖ-ի դեզամինացման ուժգնության անկում, իսկ մյուս նուկլեոտիդների համար (ԱՄՖ, ԱԵՖ և ԳԵՖ) դիտվում է դեզամինացման ուժգնության աճ չճառագայթահարված բջիջների համեմատությամբ: Հետճառագայթային ռեպարացիայի ենթարկված խմորասնկային բջիջներում ԱՄՖ-ի և ԱԿՖ-ի դեզամինացում այլևս չի դիտվում. դեզամինացման ենթարկվում են միայն ԱԵՖ, ԳԿՖ և ԳԵՖ նուկլեոտիդները: Ընդ որում, ԱԵՖ-ի դեպքում դիտվում է դեզամինացման ուժգնության անկում ճառագայթահարված բջիջների համեմատությամբ՝ բարձր մնալով չճառագայթահարված խմորասնկերին բնորոշ աստիճանից, իսկ ԳԵՖ-ի դեպքում դեզամինացման ուժգնությունը նվազում է և մնում է ցածր ինչպես չճառագայթահարված, այնպես էլ՝ ճառագայթահարված բջիջների համեմատությամբ: ԳԿՖ-ի դեզամինացման ուժգնությունը ռեպարացված խմորասնկային բջիջներում աճում է և գերազանցում է չճառագայթահարված բջիջներին բնորոշ աստիճանին:

Աղյուսակ 1

Պուրինային միացությունների դեզամինացումը *C. guilliermondii* HП-4 խմորասնկերում՝ բջիջները միլիմետրական ալիքներով ճառագայթահարելուց և հետճառագայթային ռեպարացիայից հետո (մգ N2/1գ թաց կենսազանգված, n=5, p<0.05)

Նուկլեոտիդներ	ԱՄՖ	ԱԿՖ	ԱԵՖ	ԳԿՖ	ԳԵՖ
Տարբերակ					
Չճառագայթված խմորասնկեր	0.013±0.001	0.87±0.07	0.026±0.002	0.44 ± 0.03	0.5 ± 0.02
Ճառագայթված խմորասնկեր	0.06±0.048	0.1±0.06	0.66±0.04	0.19 ±0.01	0.95±0.6
Ռեպարացված խմորասնկեր	0	0	0.24±0.018	0.76± 0.07	0.14± 0.1

Աշխատանքի հաջորդ փուլում իրականացրել ենք պուրինային նուկլեոտիդների դեզամինացման ուսումնասիրություն՝ խմորասնկային բջիջները դեցիմետրական տիրույթի ալիքներով ճառագայթահարելիս և հետճառագայթային ռեպարացիայից հետո: Ստացված տվյալները ներկայացված են աղյուսակ 2-ում:

Դեցիմետրական ալիքներով ճառագայթահարված խմորասնկային բջիջներում դիտվում է նուկլեոտիդների դեզամինացման ուժգնության աճ, բացառությամբ ԱԿՖ-ի: Մյուս նուկլեոտիդների՝ ԱՄՖ-ի, ԱԵՖ-ի, ԳԿՖ-ի և ԳԵՖ-ի համար դիտվում է դեզամինացման ուժգնության աճի ընդհանուր տենդենց: Միաժամանակ, ԱԵՖ-ի, ԳԿՖ-ի և ԳԵՖ-ի դեզամինացման ուժգնությունները միմյանցից տարբերվում են աննշան չափով: Պետք է նշել նաև, որ ԱԵՖ-ի դեզամինացման գործընթացում դիտվում է ուժգնության կտրուկ աճ՝ հետքային արժեքից (0.026 մգ N₂/1գ թաց կենսազանգվածում) ԱԵՖ-ի դեզամինացման աստիճանը հասնում է դիտարկված նուկլեոտիդների համար ամենաբարձր արժեքին՝ 1.016մգ N₂/1գ թաց կենսազանգվածում: Հետճառագայթային ռեպարացիայի ենթարկված բջիջներում նույնպես ադենինային նուկլեոտիդների դեզամինացման տեսակետից դիտվում է բոլոր նուկլեոտիդների դեզամինացման ուժգնության նվազում ճառագայթահարման ենթարկված բջիջների համեմատությամբ, սակայն դեզամինացման արժեքները բարձր են մնում չճառագայթահարված բջիջներին բնորոշ ցուցանիշներից, բացառությամբ ԱԿՖ-ի, որի դեզամինացման աստիճանը ռեպարացված բջիջներում ավելի ցածր է չճառագայթահարված բջիջների համեմատությամբ: Ռեպարացված բջիջներում դեզամինացման ուժգ-

նույնպիսի անհատները արտահայտված է ԳԿՖ-ի դեպքում: Այսպիսով, ռեպարացված խմորասկային բջիջներում դեգամինացման առավել բարձր ուժգնություն ցուցաբերում է ԳԿՖ-ը:

Աղյուսակ 2

Պուրինային միացությունների դեգամինացումը *C. guilliermondii* НП-4 խմորասկերում՝ բջիջները դեցիմետրական ալիքներով ճառագայթահարելուց և հետճառագայթային ռեպարացիայից հետո (մգ N2/1գ թաց կենսազանգված, n=5, p<0.05)

Նուկլեոտիդներ	ԱՄՖ	ԱԿՖ	ԱԵՖ	ԳԿՖ	ԳԵՖ
Տարբերակ					
Չճառագայթված խմորասկեր	0.013±0.001	0.87±0.07	0.026±0.002	0.44 ± 0.03	0.5 ± 0.02
Ճառագայթված խմորասկեր	0.6 ± 0.05	0.424 ± 0.03	1.016±0.1	1.02 ± 0.1	1.024 ± 0.09
Ռեպարացված խմորասկեր	0.35±0.02	0.28 ± 0.01	0.19 ± 0.01	2.33± 0.2	1.33± 0.1

Ամփոփում – խմորասկային բջիջներում պուրինային միացությունների դեգամինացման համեմատական ուսումնասիրությունները թույլ են տալիս եզրակացնել, որ պուրինային ազոտային հիմքերը և նուկլեոտիդները խմորասկային բջիջներում չեն ենթարկվում վերջնական կատաբոլիզմի, այլ ընդգրկվում են նուկլեոտիդների փրկության ուղիներում [5, 6], ինչը հանդիսանում է Էներգիայի և ռեսուրսների խնայման յուրօրինակ համակարգ միկրոօրգանիզմների, այդ թվում՝ նաև խմորասկերի համար: Միլիմետրական և դեցիմետրական ալիքներով ճառագայթահարված խմորասկերի համար դեգամինացման ուժգնության փոփոխություններ են դրսևորվում պոլիֆոսֆատ-նուկլեոտիդների՝ ԱԿՖ-ի, ԱԵՖ-ի, ԳԿՖ-ի և ԳԵՖ-ի դեպքում, ինչը, հավանաբար, պայմանավորված է էքստրեմալ վիճակում բջիջ պոլիֆոսֆատների մետաբոլիզմի ինտենսիվության փոփոխությամբ՝ կապված Էներգիայի պահանջարկի փոփոխության հետ: Այսպիսով, միլիմետրական և դեցիմետրական տիրույթի ալիքներով ճառագայթահարված խմորասկային բջիջներում նշված պոլիֆոսֆատները կատարում են կարևոր հարմարողական ֆունկցիաներ՝ սթրեսին հակազդելու և հետճառագայթային ռեպարացիայի ընթացքում վերականգնողական պրոցեսների Էներգետիկ պահանջը լրացնելու ուղղությամբ: Բջիջներում պոլիֆոսֆատ-նուկլեոտիդների դերը հետճառագայթային վերականգնողական պրոցեսներում պարզաբանելու համար պահանջվում են նրանց կատաբոլիզմի, մասնավորապես՝ հիդրոլիզի ակտիվության մանրամասն ուսումնասիրություններ:

Գրականություն

1. Նավասարդյան Լ.Յ., Մարության Ս.Վ. Ռենտգենյան ճառագայթման ազդեցությունը *C. guilliermondii* НП-4 խմորասկային բրոմատինի ֆլուորեսցենտային ցուցանիշների վրա // Գիտաբժշկական հանդես, 11, 2, էջ 28-32, 2016
2. Думанский Ю.Д., Сердюк А.М., Лось И.П. Влияние электромагнитных полей радиочастот на человека Киев, стр.36-38, 2007г.
3. Марутян С.В., Навасардян Л.А., Бадалян Г.Г., Шагинян М.А. Влияние рентгеновского облучения на структуру ДНК дрожжей *C. guilliermondii* НП-4. // Химия и химическая технология, т.59, вып. 3, стр.90-94, 2016.
4. Тягин Г.В. Клинические аспекты облучения СВЧ диапазона, стр.25-29, 2002г.
5. Andrew N. Lane, Teresa W.-M. Fan Regulation of mammalian nucleotide metabolism and biosynthesis. // Nucleic Acids Res, 43 (4): p.2466-2485, 2015.
6. Austin W.R., Armijo A.L., Campbell D.O., Singh A.S., Hsieh T., Nathanson D., Herschman H.R., Phelps M.E., Witte O.N., Czernin J. et al. Nucleoside salvage pathway kinases regulate hematopoiesis by linking nucleotide metabolism with replication stress. // J. Exp. Med., vol.209, p.2215-2228, 2012.
7. Shapiro MG, Priest MF, Siegel PH, Bezanilla F. Thermal mechanisms of millimeter wave stimulation of excitable cells. // Biophysical Journal, vol.104, p.2622–2628, 2013.

ՄԻԿՈԶՆԵՐԻ ԷԹԻՈԼՈԳԻԱԿԱՆ ԿԵՆՍԱՔԱՉՄԱՁԱՆՈՒԹՅՈՒՆԸ

Է. ՅՈՒ. ՍԱՐԳՍՅԱՆ

ՀՀ ԳԱԱ Հ. Բունիաթյանի անվ. կենսաքիմիայի ինստիտուտ
el.sarkisyan@mail.ru

Միկոզների հիմնական էթիոլոգիական խմբերն են՝ դերմատոմիցետները, խմորանման սնկերը և բորբոսասնկերը: Բժշկության մեջ գնալով մեծ հետաքրքրություն և նշանակություն են ձեռք բերում օպորտունիստական միկոզները, որոնք հարուցվում են պայմանական-ախտածին սնկերով՝ մարդու համար կոմենսալ հանդիսացող սնկերով (օրինակ՝ *Candida* spp.) կամ շրջակա միջավայրում լայնորեն տարածված բորբոսասնկերով (օրինակ՝ *Aspergillus* spp.): Տարեցտարի նկարագրվում են սնկերի մոտ 1200 նոր տեսակներ, որոնք կարող են դառնալ միկոզների հարուցիչներ [1]:

Միկոզներ – դերմատոմիցետներ – կանդիդա սնկեր – բորբոսասնկեր

The main etiological groups of mycosis are dermatomycetes, yeast and mould fungi. In medicine there is growing interest to opportunistic mycosis that caused by fungus, such as *Candida* spp., *Aspergillus* spp., etc). Annually, about 1200 new micromycetes species are described among them new etiological groups of mycosis [1].

Mycosis - dermatomycetes - candidal fungi – mould fungi

Основную роль в этиологии микозов играют три группы возбудителей: дерматомицеты, дрожжеподобные грибы и плесневые грибы. Растущий интерес наблюдается у медиков к оппортунистическим микозам, вызванным условно-патогенными грибковыми возбудителями, которые являются сапрофитными для человека (например, *Candida* spp.) или широко распространены в окружающей среде (*Aspergillus* spp.). Каждый год описывается около 1200 новых видов грибов, среди которых и возбудители микозов [1].

Микозы - дерматомикозы - Кандида грибы – плесневые грибы

Սնկերը հանդես են գալիս որպես էուկարիոտների առանձին, ինքնուրույն թագավորություն՝ Mycota: Այն ընդգրկում է մոտ 445 հազար տեսակ, որոնցից ավելի քան 500 տեսակներ ախտածին են համարվում մարդու համար [3]: Բնակչության մեջ առավել տարածված միկոզներից են դերմատոմիկոզները, ոտնաթաթի միկոզները, մասնավորապես եղունգաթիթեղի սնկային հիվանդությունները՝ օնիխոմիկոզները (24%), և կանդիդամիկոզները (7%), որոնց հարուցիչները հանդիսանում են *Candida* ցեղի սնկերը [6]: Միկոզների հիմնական էթիոլոգիական խմբերն են՝ դերմատոմիցետները, խմորանման սնկերը և բորբոսասնկերը:

Դերմատոմիցետներն ախտահարում են վերնամաշկը, մաշկը, մազերը, եղունգները, առաջացնելով սնկային հիվանդություններ՝ դերմատոմիկոզներ: Այժմ դերմատոմիցետներով վարակված են ողջ հասուն բնակչության 15-25% [8]:

1957թ. Ստոկհոլմում կայացած դերմատոլոգների IX Միջազգային համաժողովում ընդունվում է Գեորգի կողմից առաջադրված դերմատոմիցետների դասակարգումը, որի համաձայն, դերմատոմիցետները բաժանվում են երեք ցեղերի՝ *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*: Ներկայումս հայտնի են դերմատոմիցետների 45 տեսակներ, որոնք պատկանում են հետևյալ երեք ցեղերին՝ *Epidermophyton* (2 տեսակ, տիպիկ տեսակը՝ *E. floccosum*), *Microsporum* (18 տեսակ, տիպիկը՝ *M. audonii*), *Trichophyton* (25 տեսակ, տիպիկը՝ *T. tonsurans*):

Սնկերի սիստեմատիկ դասակարգման ժամանակակից պատկերացումների և ընդունված նոմենկլատուրայի համաձայն դերմատոմիցետները պատկանում են Ascomycota բաժնի Onygenales կարգին [9]: Մինչդեռ, Նրանց տեսակների գերակշռող մեծամասնության համար հայտնի են լույ անամորֆները (կոնիդիալ փուլ), իսկ թելեոմորֆ ձևերը (պայուսակավոր փուլ) դիտվել են որոշակի ջերմաստիճանային ռեժիմում հատուկ բաղադրությամբ

միջավայրերի վրա աճեցնելիս: Դրա հետ կապված դերմատոմիցետների նույնականացումն իրականացվում է անամորֆ ձևերի մորֆոլոգիական, կուլտուրալ և մոլեկուլյար առանձնահատկությունների հիման վրա [5]: Դերմատոմիցետներն ախտածին կարող են լինել միայն իրենց զարգացման անամորֆ փուլերում, իսկ դրանց թելեոմորֆ ձևերը՝ պաթոգեն չեն [2]:

Դերմատոմիցետներին բնորոշ է կերատինոլիտիկ ակտիվությունը, այսինքն՝ *in vitro* և *in vivo* կենդանական ծագման պոլիմերային սուբստրատի՝ կերատինի քայքայման ունակությունը: Այս կերատինազաները պատկանում են, այսպես կոչված, հիմնային սերինային պրոտեինազաներին, որոնք գործում են հիմնային կամ չեզոք միջավայրում (pH=8): Այսպես, *Trichophyton rubrum* տեսակն ունի հետևյալ պրոտեինազային ֆերմենտները՝ 25; 31; 45; 53; 71; 93 և 124 kDa համապատասխան մոլեկուլային մասսաներով:

Սովորաբար օպորտունիստական միկոզները զարգանում են այն մարդկանց մոտ, ովքեր ունեն լուրջ առաջնային հիվանդություն և թույլ իմունային համակարգ:

Candida ցեղի խմորանման սնկերով հարուցվող սնկային ախտահարումները՝ կանդիդամիկոզները, հայտնի են եղել դեռևս Հիպոկրատի ժամանակներից *stomata aphtoides* և *aphta infantis* անուններով, բայց առաջին անգամ նկարագրվել է 1839թ. Բ. Լանգենբեկի կողմից: Իսկ առաջին անգամ 1848թ. Ֆ.Թ. Բերգը բացահայտել է խմորանման սնկերի առկայությունը հիվանդի հյուսվածքներում: Յետագայում Մ. Բերթուլը 1923թ. խմորանման սնկերից առանձնացրել է մի ցեղ, որը 1939թ. Մանրեաբանների III Միջազգային կոնգրեսում ստացել է *Candida* անվանումը:

Candida ցեղի խմորանման սնկերը ժամանակակից դասակարգման մեջ պատկանում են Ascomycota բաժնի Saccharomycetes դասի *Saccharomycetales* կարգին (անասկոսպորայիններ) [10], իսկ քանի որ դրանց մոտ բացակայում է կենսական ցիկլի սեռական փուլը և բազմանում են բողբոջմամբ, ապա դրանց ներառում են դեյտերոմիցետների «Անկատար սնկեր» ֆորմալ բաժնի մեջ (*Fungi imperfecti* կամ *Deuteromycota*) [4]: *Candida* ցեղի խմորանման սնկերը համարվում են պայմանական-ախտածին աերոբ միկոոթորանիզմներ, որոնք ոչ միջոցալ փուլում ունեն կլորավուն, էլիպսաձև, օվալաձև բջիջների՝ բլաստոսպորների տեսք, իսկ միջոցալ փուլում՝ հիֆերի տեսք: Խմորանման սնկերն իրական միցել չեն առաջացնում, այլ երկարաձգված բջիջների համակցմամբ ձևավորում են պսևդոմիցել՝ կեղծ սնկաթել:

Տարբեր հեղինակներ ներկայացնում են կանդիդամիկոզների հարուցիչների տարբեր որակական և քանակական կազմ: Այսպես, Վ.Լ. Տյուտյունիկի և Ն.Վ. Օրջոնիկիձեի տվյալների համաձայն հայտնի են *Candida* ցեղի 196 տեսակ, որոնցից մարդու լորձաթաղանթից անջատվել են ավելի քան 27 տեսակ [7]:

Վերջին տարիներին դիտվում է *Candida* ցեղի տեսակների ընդհանուր թվի աճ: Եթե, օրինակ, 1989թ. Կ.Պ. Կուրտցմանի և Ջ.Ու. Ֆելլայի խմորանման սնկերի որոշիչում նկարագրված էին *Candida* ցեղի 163 տեսակներ, ապա 2010թ. դրանց թիվն աճել է մինչև 743 տեսակի (*Index Fungorum*): Դրան զուգահեռ աճել է նաև հոմանիշների թիվը: Այսպես, 1954թ. Ն.Ֆ. Կոնանտը և այլոք նշել են, որ միայն *C. albicans* տեսակի համար նկարագրված են մոտ 190 հոմանիշ: Հավանաբար, անհրաժեշտ է ցուցակից բացառել վաղուց հնացված և չօգտագործվող հոմանիշները:

Candida խմորանման սնկերը մասնակցում են նաև օնիխոմիկոզի էթիոլոգիայում: Եթե նախկինում մաշկի և եղունգի խմորասնկային ախտահարման դեպքում հիմնական հարուցիչ էր համարվում *C. albicans* տեսակը, ապա այժմ ավելի հաճախ նույնականացվում են *Candida non-albicans* տեսակները՝ *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. famata*, *C. glabrata*, *C. lusitanae*, *C. inconspicua*, *C. zeylanoides*, *C. laurentii*, որոնցից շատերը կայուն են ընդհանուր և տեղային ազդեցությամբ ժամանակակից հակամիկոտիկների նկատմամբ:

Եթե նախկինում որպես կանդիդոզի հիմնական հարուցիչներ համարվում էին հետևյալ 5 տեսակները՝ *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. pseudotropicalis* (= *C. kefyr*), *C. tropicalis*, ապա այժմ որպես կանդիդամիկոզների հարուցիչներ հանդես են գալիս *Candida* ցեղի մոտ 20 տեսակ [6], (աղ. 1):

Աղյուսակ 1. Կանդիդոզի հարուցիչները

Հիմնական հարուցիչները	Հազվադեպ հարուցիչները	Եզակի դեպքեր
<i>C. albicans</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. glabrata</i>	<i>C. krusei</i> <i>C. kefyr (=C. pseudotropicalis)</i> <i>C. guilliermondi</i> <i>C. lusitaniae</i>	<i>C. catenulata</i> <i>C. ciferrii</i> <i>C. famata</i> <i>C. haemulonii</i> <i>C. inconspicua</i> <i>C. lambica</i> <i>C. lipolytica</i> <i>C. norvegensis</i> <i>C. pelliculosa</i> <i>C. rugosa</i> <i>C. utilis</i> <i>C. viswanathii</i> <i>C. zeylanoides</i>

Վերջին տարիներին հայտնաբերվել են *Candida* ցեղի ախտածին նոր տեսակներ, դրանք են՝ *C. dubliniensis*, *C. nivariensis*, *C. bracarensis*, *C. pseudohaemulonii*, *C. Pseudorugosa*, *C. subhashii*, *Candida auris* և այլն:

Բնության մեջ լայնորեն տարածված բորբոսասնկերից են *Aspergillus* ցեղի սնկերը, որոնք հաշվվում են մոտ 200 տեսակներ: *Aspergillus* ցեղն առաջին անգամ նկարագրվել է սնկաբան Պ. Միխելի կողմից 1729թ., իսկ ավելի ուշ, 1856թ. հաստատվել է այդ ցեղի որոշ տեսակների որպես էթիոլոգիական գործոնի նշանակությունը տարբեր հիվանդությունների ժամանակ: Որպես սնկային հիվանդությունների (վերին շնչուղիների ասպերգիլոզների, օնիխոմիկոզների, օտոմիկոզների և այլն) հարուցիչներ առավել լավ են ուսումնասիրված *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigates*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae* տեսակները և այլն:

Որոշ միկրոմիցետներ՝ *Fusarium* spp., *Paecilomyces lilacinus*, *Acremonium* spp., *Scedosporium prolificans*, *Malassezia furfur*, *Candida (=Torulopsis) glabrata*, *Rhodotorula mucilaginosa (= R. rubra)*, *Saccharomyces cerevisiae* և այլն, տարբեր ծագմամբ նեյտրոպենիա ունեցող հիվանդների մոտ (լեյկոզ, օրգանների փոխպատվաստում, կրոտիկոստերոիդների և ցիտոստատիկների կիրառում, ճառագայթային ախտահարում) կարող են առաջ բերել ֆունգեմիա: Առողջ մարդկանց մոտ այս սնկերը հազվադեպ են դառնում հիվանդության պատճառ [11]:

Դերմատոմիցետների հետ համեմատած՝ *Scopulariopsis brevicaulis*, *Hendersonula toruloidea*, *Scytalidium* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Cephalosporium* spp., *Alternaria* spp., *Penicillium* spp. բորբոսասնկերն օժտված են առավել թույլ արտահայտված կերատինազային և պրոտեինազային ակտիվությամբ: Դրանով է պայմանավորված դրանց երկրորդական դերը հատկապես օնիխոմիկոզի էթիոլոգիայում:

Ախտածին սնկերի մեջ կան նաև ոչպայմանական ախտածիններ կամ մակաբույծներ, որոնց լաբորատոր պայմաններում հնարավոր չէ կուլտիվացնել սննդամիջավայրերի վրա, օրինակ՝ *Lacazia loboi*, *Pneumocystis carinii* [2]:

Հարկ է նշել, որ տարեցտարի նկարագրվում են սնկերի մոտ 1200 նոր տեսակներ, որոնք կարող են դառնալ միկոզների հարուցիչներ [1]: Ուստի միկոզների արդյունավետ բուժման համար անհրաժեշտ է հաշվի առնել էթիոլոգիական գործոնի կարևորությունը:

Գրականություն

1. Елинов Н.П. Некоторые преодолимые проблемы для медицинских микологов // Проблемы медицинской микологии.- СПб.- 2010.- Т.12, N 1.- С. 3 - 9.

2. Елинов Н.П. Новое в таксономии *Candida species* // Проблемы медицинской микологии. - СПб.- 2010.- Т. 12, N 3. - С. 3 - 9.
3. Яковлев А.Б. Микроспория, трихофития, фавус //Пособие для врачей. Москва, 2013
4. Мюллер Э., Леффлер В. Микология // Пер. с нем.- М.: Мир.- 1995.- 343с.
5. Руденко А.В., Коваль Э.З., Рыжко П.П., Заплавская Е.А. Онихомикозы у жителей Украины // Киев: ООО "ТСК", 2001.- 248 с.
6. Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В. Грибковые инфекции. Руководство для врачей.- М.- 2008.- 480 с.
7. Тютюнник В.Л., Орджоникидзе Н.В. Вагинальный кандидоз и беременность. // Русский медицинский журнал. - 2001. - Т. 9, N 19. - С. 34 - 37.
8. Gupta A.K., Jain H.C., Lynde C.W. Prevalence and epidemiology of onychomycosis in patients visiting physicians' offices: a multicenter Canadian survey of 15000 patients // J Am Acad Dermatol. - 2000. - Aug; 43(2 Pt1): 244-248
9. Kirk P.M., Cannon P.F., David J.C., Staples J.A. Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi. 9th ed. CAB International, Wallingford. - 2001. - 655 p
10. Kirk P.M., Cannon P.F., Minter D.W., Stalpers J.A. Dictionary of the Fungi. 10 th ed. CAB International, Wallingford.- 2008.- 640 p.
11. Specchia G., Pastore D; Montagna MT et al., Fungemia in acute leukemia patients: A single institution's experience // Microbiologica.- 2004.- Volume 27, Issue 4, pp. 407 - 410.

Биолог. журн. Армении, 1 (69), 2017

ВЛИЯНИЕ ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО СТРЕССА НА НЕКОТОРЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРОЛИКОВ

Н. АЙРАПЕТЯН*, А. АГАДЖАНЫН, М. ХАЧАТРЯН, А. ТРЧУНЯН

Ереванский государственный университет, кафедра биохимии, микробиологии и биотехнологии
nn.hayrapetyan@gmail.com

Исследовалось влияние иммобилизационного стресса на биохимические показатели углеводного обмена в сыворотке крови кроликов. В течение 30-ти дневной иммобилизации проявлялась стойкая гипергликемия, наблюдалось накопление лактата - показателя кислородной задолженности тканей. Полученные результаты свидетельствуют о негативном влиянии иммобилизации на организм животных.

Иммобилизационный стресс – гипергликемия- анаэробный гликолиз – тканевая гипоксия

In the current study the influence of immobilization stress on the biochemical characteristics of carbohydrate metabolism in rabbits, especially glucose level has been investigated. During the experimental period in serum the animals which were put immobilization hyperglycemia was demonstrated. Accumulation of lactate has been detected, which is an indicator of the lack of oxygen in tissues. Therefore, the negative effect of immobilization stress on the organism of animals was shown.

Immobilization stress – hyperglycemia – anaerobic glycolysis – tissue hypoxia

Ուսումնասիրվել են ճագարների արյան շիճուկում ածխաջրային փոխանակության կենսաքիմիական ցուցանիշները շարժողական ակտիվության սահմանափակման պայմաններում: 30 օրյա անշարժացման պայմաններում դիտվել է գլյուկոզի և կաթնաթթվի մակարդակի աճ: Ստացված արդյունքները վկայում են կենդանիների օրգանիզմի վրա սթրեսի բացասական ազդեցությունը:

Սթրես – հիպերգլիկեմիա – անաերոբիկ գլիկոլիզ - հյուսվածքային թթվածնաքաղց

Вынужденное ограничение двигательной активности – иммобилизационный стресс сопровождается неблагоприятными метаболическими перестройками организма и приводит к развитию целого комплекса негативных проявлений, а также являясь неизбежным фактором сопутствующим тяжелые патологии, существенно осложняет течение основного патологического процесса. Иммобилизационный стресс, проявляющийся характерной реакцией со значительным усилением интенсивности свободнорадикальных реакций и накоплением продуктов липопероксидации, обуславливает неблагоприятные метаболические сдвиги со стороны всех видов обмена веществ, включая белковый, углеводный, липидный и пуриновый обмены [12]. Более того, продолжительная иммобилизация, в результате накопления и склеивания клеток иммунной системы, ведет к образованию нестабильных атеросклеротических бляшек, вызывая тромбоз и сердечно-сосудистые осложнения [9]. Биохимический механизм, объясняющий возникновение патологических состояний под действием стрессогенных факторов различной природы, до конца не изучен.

Одним из процессов, быстро реагирующих на стресс, является гликолиз, активация которого в стадию стресс - синдрома обеспечивает возросший энергетический дисбаланс, а накопление недоокисленных продуктов гликолиза при определенных условиях становится причиной развития патологических явлений в органах [10]. Нарушение катаболизма глюкозы приводит к метаболическим изменениям, характеризующимся высоким уровнем глюкозы (гипергликемия). В основе развития гипергликемии лежит инсулинорезистентность и нарушение функции β -клеток поджелудочной железы [6]. Гипергликемия играет решающую роль в развитии и прогрессировании осложнений сахарного диабета со множественными механизмами, включая усиление оксидативного стресса, снижение окисления глюкозы [4, 5]. Также известно, что в период развития стрессорного воздействия активизируется анаэробный путь энергообразования – анаэробный гликолиз [14]. Ключевые метаболиты анаэробного энергообеспечения - молочная и пировиноградная кислоты могут быть критериями энергетического гомеостаза. А увеличение показателя лактат/пируват при иммобилизационном стрессе предполагает направленность энергообразования по анаэробному пути гликолиза. В последние годы была разработана концепция «порога анаэробной нагрузки организма». Основной результат, поддерживающий гипотезу анаэробного порога, состоит в том, что при нарастающей интенсивности стрессорного воздействия концентрация лактата в крови резко увеличивается, что было ранее принято за внезапное начало продукции лактата [8, 11]. В настоящее время исследования показывают, что лактат образуется и в условиях достаточного поступления кислорода и продукция лактата не обязательно связана с анаэробными условиями. Это, в свою очередь, позволяет утверждать, что изменение концентрации лактата не дает информации о причинах его образования, а отражает баланс между выходом лактата в кровь и его устранением из крови [16].

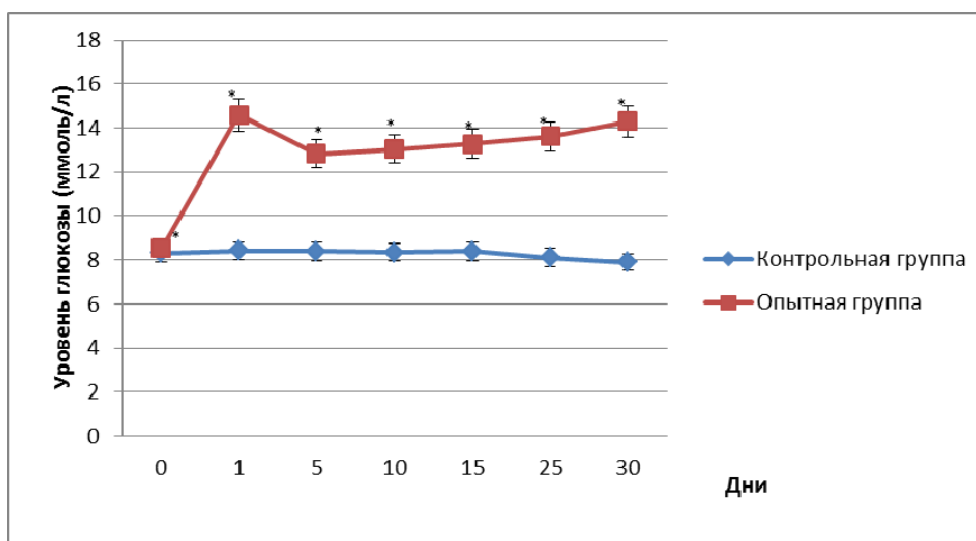
Целью работы было изучение особенностей влияния иммобилизационного стресса на некоторые биохимические показатели углеводного обмена.

Материалы и методика. Для исследования воздействия иммобилизации на показатели углеводного обмена были выбраны домашние кролики (*Oryctolagus cuniculus*). Иммобилизацию кроликов-самцов массой 2000 - 2200 г проводили в течение 30 суток (по 3 часа ежедневно). Животные были разделены на 2 группы, по 3 кролика в каждой группе (n=6). Контрольная группа содержалась в обычных условиях вивария (в нормальном физиологическом состоянии). Опытная группа крови, находилась в условиях иммобилизационного стресса. Формирование стресс-фактора вызывали путем горизонтальной фиксации кроликов в спинном положении на доске. Биохимические показатели исследовались на 0, 1, 5, 10, 15, 25 и 30-ые сутки эксперимента. В сыворотке крови уровень глюкозы определяли глюкозооксидазным

методом [15], лактат - методом Уффельмана, пируват – модифицированным методом Фредмана и Хаугена [3]. Сыворотку получали центрифугированием 3000 g в течение 10 мин при 4°C. По завершении эксперимента животных выводили из опыта декапитацией. Вышеуказанные показатели исследовались в гомогенатах печени, мышц, мозга декапитированных кроликов. Содержание гликогена в тканях печени, мышцах и почках определяли методом Данченко [1].

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием параметрического t-критерия Стьюдента. Обработка данных производилась с помощью компьютерной программы „Statistica 6.0” [2].

Результаты и обсуждение. При изучении показателей углеводного обмена в сыворотке крови экспериментальных животных в первый день стрессорного воздействия отмечалось достоверное увеличение содержания глюкозы на 44%, уменьшение содержания пирувата на 16% (0.021 мкмоль/л, $p<0.05$) при одновременном повышении уровня лактата на 30% (1.52 мкмоль/л, $p<0.05$) относительно контрольной группы (0.025 мкмоль/л и 1.17 мкмоль/л соответственно) (рис. 1,2). На 5-ый день стресса наблюдалось незначительное снижение уровня глюкозы по сравнению с 1-ым днем (14.59 ± 0.01 ммоль/л, 12.82 ± 0.01 ммоль/л, $p<0.05$ соответственно). Возможно, некоторое снижение связано с временной адаптацией животных к стрессу. Однако на 30-ые сутки иммобилизации в сыворотке крови животных был зарегистрирован максимальный уровень гипергликемии (45%, $p<0.05$) по сравнению с контрольной группой животных. Следовательно, можно отметить, что данный вид стресса характеризуется гипергликемией, что является важным признаком развития стресс-реакций.

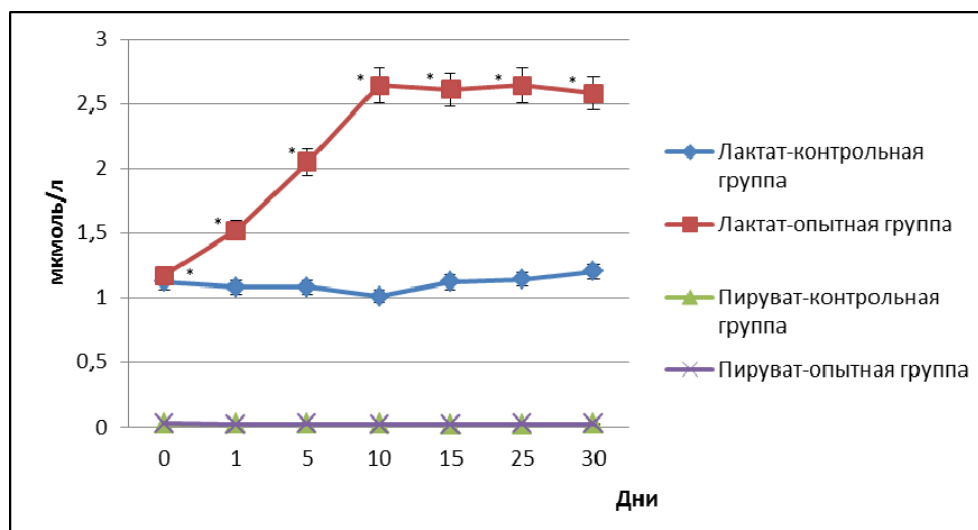


*- достоверно по отношению к контрольной группе животных ($p<0.05$)
Рис. 1. Уровень глюкозы в сыворотке крови экспериментальных животных при иммобилизационном стрессе.

Уровень пирувиноградной кислоты на 5-ый день был ниже значений контрольной группы на 14% и далее сохранялся на том же уровне, концентрация молочной кислоты на 5-ый день повысилась на 75%, на 10-ый день - на 126% и далее фиксировался стабильно высокий уровень молочной кислоты до конца эксперимента (рис. 2). Повышение концентрации молочной кислоты в опытной группе, вероятно,

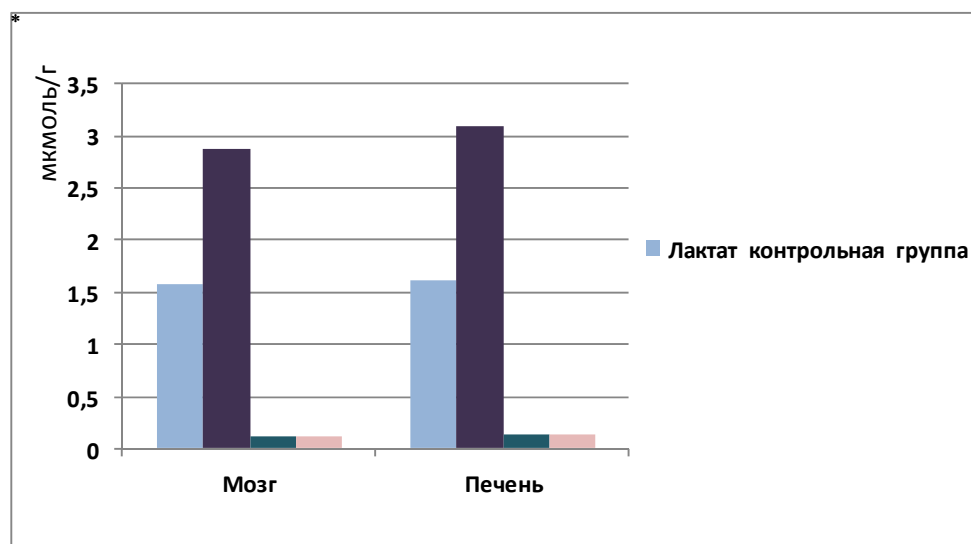
является результатом блокирования аэробных процессов гликолиза и активации анаэробного гликолиза. Подобный сдвиг ключевого фрагмента углеводного обмена – гликолиза в сторону накопления молочной кислоты прерывает физиологически оправданный процесс энергообеспечения и нарушает энергетический обмен клетки.

Полученные данные свидетельствуют о неблагоприятном влиянии ограничения двигательной активности на состояние углеводного обмена, которое проявлялось уже на 1-ый день стрессорного воздействия.



*- достоверно по отношению к контрольной группе животных ($p < 0.05$)

Рис. 2. Влияние стрессового воздействия на показатели пирувата, лактата в сыворотке крови кролика.



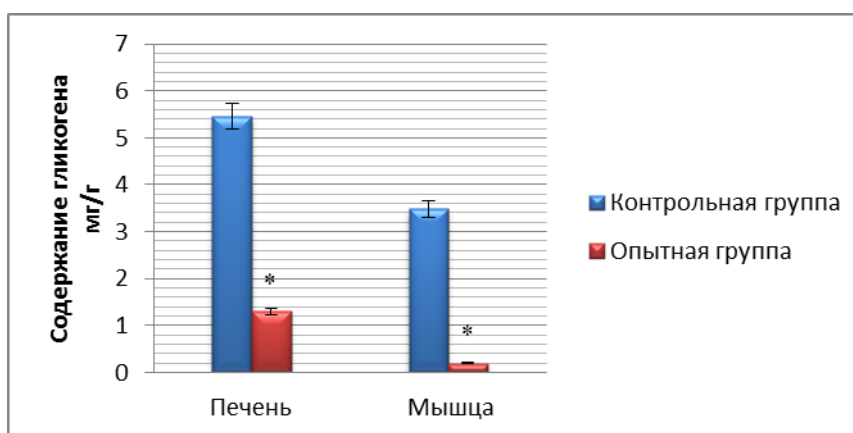
*- достоверно по отношению к контрольной группе животных ($p < 0.05$)

Рис. 3. Изменения содержания пирувата и лактата тканей печени и мозга кроликов, иммобилизованных в течение 3 ч (30 дней).

Поскольку ограничение двигательной активности затрагивает жизнедеятельность всего организма, целесообразно было рассмотреть ее влияние на биохимические процессы в тканях экспериментальных животных. Исследования показали значительные изменения концентрации молочной кислоты и пирувата. Уровень пирувата в ткани мозга был выше на 5%, в ткани печени на 13.8%, уровень лактата в ткани мозга превышал физиологические значения на 82.3%, в ткани печени на 90.7% (рис.3). Значительное увеличение концентрации лактата на фоне отставания роста концентрации пирувата в гомогенатах исследуемых органов также свидетельствует об усилении процессов анаэробного гликолиза на фоне замедления аэробного. Данные позволяют предположить о развитии возникшей в результате иммобилизационного стресса тканевой гипоксии и нарушении аэробных энергозависимых процессов в тканях.

Известно, что инсулин в печени стимулирует активность гликогенсинтазы и ингибирует гликогенолиз, а также играет ключевую роль в выработке эндогенной глюкозы [7]. Вследствие недостатка инсулина или инсулинорезистентности снижается способность печени запасать гликоген. Это явление связано с повышением активности гликогенфосфорилазы, что приводит к гипергликемии [4, 13].

Исследовалось содержание гликогена в печени и мышцах контрольной и подвергнутых стрессу групп (рис. 4).



* - достоверно по отношению к контрольной группе животных ($p < 0.05$)

Рис. 4. Содержание гликогена в печени и мышцах экспериментальных животных.

Результаты исследований показали, что под воздействием иммобилизации наблюдалось значительное истощение запасов гликогена в печени и мышцах животных в 5.5 и 3.8 раз соответственно, что характеризует снижение активности гликогенсинтазы в результате недостаточной выработки инсулина. В течение всего эксперимента наблюдается высокий уровень гликемии, сопровождающийся истощением гликогена в печени.

Литература

1. Данченко Е.О., Чиркин А.А. Новый методический подход к определению концентрации гликогена в тканях и некоторые комментарии по интерпретации результатов, Суд.-мед. Эксперт, 3, 25-27, 2010.
2. Кобзарь А.И. Прикладная математическая статистика, М., Физматлит, 816 с., 2006.
3. Кондрахин И.П. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики, Справочник, М., Колос, 520 с., 2004.

4. Ablat A., Halabi M., Mohamad J., Hasan M., Hazni H., Teh S., Shilpi J., Mohamed Z., Awang Kh. Antidiabetic effects of *Brucea javanica* seeds in type 2 diabetic rats, BMC Compl Altern Med., 17, 94, 2017.
5. Auberval N. et al. Oxidative stress type influences the properties of antioxidant containing polyphenols in RINm5F beta cells, Evid Based Compl Altern Med., 15(1), 236, 2015.
6. Bahar E., Akter K., Lee G., Lee H., Rashid H et al. β -Cell protection and antidiabetic activities of *Crassocephalum crepidioides* (Asteraceae) Benth.S.Moore extract against alloxan-induced oxidative stress via regulation of apoptosis and reactive oxygen speices (ROS), BMC Compl Altern Med. 17, 179, 2017.
7. Kondeti VK, Badri KR, Maddirala DR, Thur SK, Fatima SS, Kasetti RB, Rao CA. Effect of *Pterocarpus santalinus* bark on blood glucose, serum lipids, plasma insulin and hepatic carbohydrate metabolic enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats, Food Chem Toxicol, 48, 1281-1287, 2010.
8. Mekitarian F.E, Horita S.M., Gilio A.E. et al Cerebrospinal fluid lactate level as a diagnostic biomarker for bacterial meningitis in children, Int. J. Emerg. Med., 7, 14, 2014.
9. Moodley K, Joseph K, Naidoo Y, Islam Sh and Mackraj I. Antioxidant, antidiabetic and hypolipidemic effects of *Tulbagia violacea* Harv. (wild garlic) rhizome methanolic extract in a diabetic rat model, BMC Compl Altern Med., 15, 40, 2015.
10. Nayanatara A.K., Tripathi Y., Nagaraja H.S. et al Effect of chronic immobilization stress on some selected Physiological, biochemical and lipid parameters in Wistar Albino rats, Res J Pharmaceut Biol Chem Sci., 3, 34-42, 2012.
11. Philp A., Macdonald A.L., Watt P.W. Lactate – a signal coordinating cell and systemic function, J Exp Biol 208, 4561- 4575, 2005.
12. Proia P., Di Liegro C.M., Schiera G. et al Lactate as a metabolite and a regulator in the central nervous system, Int J Mol Sci, 17, 1450, 2016.
13. Rajas F., Labruno P., Mithieux G. Glycogen storage disease type 1 and diabetes: Learning by comparing and contrasting the two disorders. Diabetes Metab, 39 (5), 377-87, 2013.
14. Richard A.H., Tindale L., Lone A. et al Aerobic glycolysis in the frontal cortex correlates with memory performance in wild-type mice but not the APP/PS1 mouse model of cerebral amyloidosis, J. Neurosci, 36, 1871–1878, 2016.
15. Trinder P. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen, J Clin Pathol., 22, 158-61, 1969.
16. Vaibhav W. Influence of stress and fluoxetine on immobility period of mice in tail suspension test and forced Swim test, Asian J Pharmaceut Clin Res, 9, 302-305, 2016.

Биолог. журн. Армении, 1 (69), 2017

ТРАНСЛОКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ ОПУХОЛЕВЫХ ПРОЦЕССАХ

А. М. АКОПЯН, А. А. АГАБАБОВА

Институт биохимии им. Г. Бунятына НАН РА
hakobyan_angelika@mail.ru

У макроорганизма негативные последствия транслокации наступают только тогда, когда развивается массивная бактериемия, а в процессе бактериальной миграции вовлекаются специфические клоны *E. coli* с комплексом свойств защитной и агрессивной направленности: повышенная серорезистентность, факторы бактериальной персистенции, токсины и т. п. В результате проведенных исследований получены данные о функционировании системы "бактерия- эритроцит" с учетом уровня экспрессии свойств микроорганизмов и внутриэритроцитарного их влияния. Установлен феномен внутриэритроцитарного взаимодействия бактерий.

опухоль-острый лейкоз-транслокация-кишечная палочка

Տրանսլոկացիայի բացասական հետևանքները մակրոօրգանիզմի մոտ առաջանում են այն ժամանակ, երբ զարգանում է զանգվածային բակտերեմիա, իսկ բակտերիալ միգրացիայի պրոցեսում ներգրավվում են *E. coli* սպեցիֆիկ կոններ պաշտպանական և ագրեսիվ ուղղվածությամբ հատկությունների կոմպլեքսով՝ բարձր սերոնեզիստենտություն, բակտերիալ պերսիստենցիայի գործոններ, տոքսիններ և այլն: Իրականացված հետազոտությունների արդյունքում ստացվել են տվյալներ «բակտերիա-էրիթրոցիտ» համակարգի գործունեության մասին՝ հաշվի առնելով միկրոօրգանիզմի հատկությունների էքսպրեսիայի մակարդակը և ներէրիթրոցիտային նրանց ազդեցությունը: Հայտնաբերվել է բակտերիաների ներէրիթրոցիտային փոխազդեցության ֆենոմենը:

ուռուցք- սուր լեյկոզ- տրանսլոկացիա-աղիքային ցուպիկ

In a macroorganism, the negative effects of translocation occur only when massive bacteremia develops, , and in the process of bacterial migration specific clones of *E. coli* with a complex of properties of protective and aggressive orientation are involved: increased serousresistance, factors of bacterial persistence, toxins, etc. As a result of the studies, data on the functioning of the "bacterium-erythrocyte" system were obtained, taking into account the level of expression of the properties of microorganisms and their intra-erythrocyte effect. The phenomenon of intra-erythrocyte interaction of bacteria was established.

Tumor-Acute leukemia-Translocation-Escherichia coli

Проблема канцерогенеза является одной из важнейших в современной медицине. Сопутствующие инфекции часто способны вызвать регрессию опухоли и в какой- то степени этот феномен обусловлен транслокацией условно-патогенных микробов и действием их токсинов, цитокинами и другими факторами. В частности, американский ученый Шир с коллегами выделили активное вещество липополисахарид (ЛПС) и показали, что в ответ на него в сыворотке мышей образуется фактор вызывающий геморалический некроз опухоли [1]. Как и почему развиваются воспалительные заболевания? С одной стороны-генетическая предрасположенность, нарушение иммуновоспалительной толерантности, несбалансированный ответ на собственные микробные антигены, с другой – нарушение энергообеспечения нормальных функций, в том числе и барьерной. Особая роль принадлежит микроглии кишечника. Хроническая эндотоксинемия, как результат дисфункции кишечного барьера, формируют устойчивое воспалительное состояние в околожелудочковых зонах мозга, с последующей дестабилизацией гематоэнцефалического барьера и распространением воспаления на другие участки мозга [2].

Позитивную роль микрофлоры кишечника трудно недооценить: регуляция газового состава кишечника и других полостей организма: морфокинетическое действие (у безмикробных животных снижена митотическая активность эритроцитов, скорость их миграции по микроворсинкам), участие в водно-солевом обмене, в рециркуляции желчных кислот, холестерина и других макромолекул, обеспечение колонизационной резистентности и участие в неспецифической стимуляции иммунокомпетентных клеток и тканей (адьювантно – активные соединения, имеющие в качестве действующего начала ЛПС и мурамил дипептид) образуются из нормальной микрофлоры кишечника человека и животных под воздействием лизоцима и других литических агентов, постоянно присутствующих в просвете кишечника [3].

Материалы и методы

Нами было обследовано более двадцати больных с аденокарциномой сигмовидной кишки. Бактериологическое исследование проводили согласно методическим указаниям по микробиологической диагностике заболеваний, вызванных энтеробактериями. Идентификацию высеваемых микроорганизмов проводили с помощью биохимических тестов [4]. Для ультраструктурных исследований использовали методы, принятые в электронной микроскопии для изучения микробов [5]. Просмотр и съемку проводили при помощи электронного микроскопа BS 613 фирмы „Tesla“.

Эритроциты получали у больных с острым лейкозом. На определенную часть эритроцитарного осадка *in vitro* добавляли взвесь кишечной палочки, а на другую часть – физиологический раствор (контроль). После 2-х часовой инкубации взвеси центрифугировали, полученные осадки обрабатывали по общепринятой в электронной микроскопии методике [5], фиксировали 2.5% раствором глутаральдегида, приготовленным на 0.1 М фосфатном буфере с РН 7.2-7.4, дефиксировали 1% раствором OSO_4 на том же буфере. Готовые эпон-аралдитовые блоки резали на австрийском ультратоме фирмы «Reichert - Guhg». Просмотр и съемку ультратонких контррастированных срезов проводили при помощи электронного микроскопа BS 613 фирмы „Tesla“.

Результаты и обсуждение

Наши исследования показали, что в основном высевалась кишечная палочка, причем как *lact*+, так и *lact*- формы. Что касается численности “внекишечной” популяции *E.coli*, то в момент операции ее количество было максимально, на второй день уменьшалось и вновь восстанавливалось на 3-4-й день после операции.

Согласно полученным данным у макроорганизма при патологии (аденокарцинома сигмовидной кишки) наблюдается активация процесса транслокации фекальной флоры, в частности *E.coli*, из кишечника и выход ее в кровь, а соответственно, инфицирование внутренних органов и опухоли.

Еще в конце XIX столетия хирург У. Коли обратил внимание на то, что сопутствующие инфекции у онкологических больных вызывали частичное рассасывание опухоли. Инфекционный процесс эндогенного и экзогенного происхождения нередко сопровождается самыми различными повреждающими воздействиями на макроорганизм, в том числе обширные ожоги, радиационное поражение, политравму, массивную кровопотерю, и осложняет течение патологии. Причем у таких больных из крови чаще всего высеиваются энтеробактерии [6]. Во всех этих случаях наблюдается следующий ключевой момент: эшерихии из микробиоценоза кишечника при нарушении иммунобиологических барьеров макроорганизма транслоцируются в мезентеральные лимфоузлы и через портальную венозную систему в кровеносное русло; возникающая при этом бактеремия способствует диссеминации эшерихий в макроорганизме с инфицированием его внутренних органов.

Ультратонкие срезы *E.coli*, полученные из кала онкологических больных, представлены на разных стадиях роста и размножения. Наблюдались бактерии, находящиеся в логарифмической и стандартной фазах, с нормальным строением бактериальной оболочки, цитоплазмой, наполненной выраженными фибриллами ДНК. Однако, у некоторых бактерий имеются изменения в виде сжатия цитоплазмы в кончике палочки и ее отслоения от клеточной стенки вместе с цитоплазматической мембраной. Обнаружена группа бактерий с плазмолизом. Циркулирующие в крови больного кишечные палочки на ультратонких срезах в основном сходны с контрольными. Часто клеточная стенка несколько отстает от цитоплазматической мембраны, иногда видны нечеткие контуры бактериальной стенки. У некоторых бактерий на одном из двух концов видно очаговое расширение периплазматического пространства (рисунок 1).

Полученные электронно-микроскопические данные показывают, что если кишечник, где происходят изменения с микробом, иногда необратимые (образование бесструктурных протопластов), является наименее благоприятной средой для *E. coli*, то кровь, а тем более опухоль – наиболее благоприятные условия для ее существования.



Рис. 1. Очаговое расширение периплазматического пространства.

Возможность проникновения эшерихий за пределы кишечника определяется не только качественными (инвазивными) характеристиками бактерий, сколько дефектами в системе колонизационной резистентности хозяина. Развитие последних сопряжено с ослаблением барьерной функции кишечного микробиоценоза (в том числе за счет количественного снижения его анаэробного звена – бифидумбактерии и др.), повышением проницаемости мукозной выстилки кишечника и нарушением иммунного статуса макроорганизмов [7].

Таким образом, кишечные палочки – возбудители кишечных и внекишечных эшерихиозов различаются по характеру складывающихся симбиотических взаимоотношений макроорганизмов; первые, как правило, исходно формулируют паразитогостальные связи, тогда как вторые преимущественно вступают в комменсальные отношения с хозяином.

Бактерицидные свойства крови и других биологических жидкостей организма играют важную роль в защите организма от инфекции. Они обусловлены как иммунными, так и неиммунными механизмами. К первым относится бактериолитический эффект антител и комплемента, ко вторым – различные бактерицидные белки (протеины, увеличивающие пермеабиллизацию бактерий, лизоцим, лактоферин и др.) и антибактериальные пептиды (дефeksiны, кателицидины) [8].

Поскольку цель последующего исследования *in vitro* оценить роль бактерий в развитии опухолевых процессов и изучить структурные изменения, происходящие с эритроцитами, выделенными у больных острым лейкозом, то полученные данные показали, что эритроциты больных острым лейкозом находятся в состоянии анизоцитоза и пойкилоцитоза, иногда наблюдались эритроциты, увеличенные в три-четыре раза, при этом они приобретали самые разнообразные, причудливые формы (рисунок 2,4).



Рис. 2 Эритроциты причудливой формы.



Рис. 3 Скопления *E. coli*, обычной формы и строения.

На срезах между эритроцитами выявлялись скопления *E. coli*, которые не делились и имели обычную форму и строение (рисунок 3).

При больших увеличениях было видно, что иногда бактерии приближались к эритроцитам, без признаков адгезии. Наблюдалась эритроциты, в разных частях которых обнаруживались мелкие, светлые и круглые образования. Часть этих образований с ровными краями располагалась внутри эритроцита, другая часть с зазубренными очертаниями подходила ближе к поверхности эритроцита (рисунок 4).

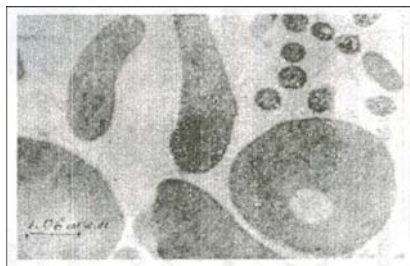


Рис. 4. Эритроциты с мелкими, светлыми и круглыми образованиями.

Неровные края светлых образований свидетельствовали о разрушении цитоплазматической мембраны эритроцита (рисунок 5).

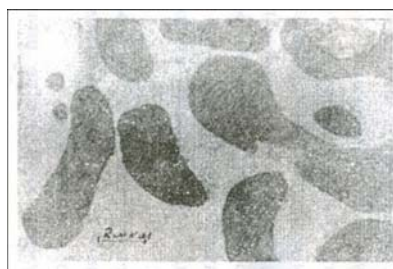


Рис.5. Разрушенная цитоплазматическая мембрана эритроцита.

Вероятно, разрушение происходило в результате воздействия бактерий кишечной палочки [5]. Центально расположенные пузырьки имели разные размеры и, видимо, образовывались после соединения приближающихся отростков измененных эритроцитов (рисунок 6).



Рис. 6. Измененные эритроциты, центрально расположенные пузырьки.

В результате проведенных исследований получены данные о функционировании системы "бактерия-эритроцит" с учетом уровня экспрессии свойств микроорганизмов и внутриэритроцитарного их влияния. Установлен феномен внутриэритроцитарного

взаимодействия бактерий. В пользу этого предположения свидетельствуют разрушение цитоплазматических мембран эритроцитов и появление в них пузырьков с зазубренными краями.

Возможно, взаимодействие бактерий с эритроцитами осуществляется посредством факторов патогенности. Особое место в ряду факторов патогенности занимают внеклеточно секретируемые молекулы с мембрано-повреждающей способностью, получившие общее название "гемолизины". Микроорганизмы, синтезирующие данные молекулы, обладают гемолитической активностью, в результате чего происходит лизис эритроцитов с последующим освобождением гемоглобина [9].

Для реализации и усиления патогенных свойств микроорганизмам необходимо определенное количество железа, которое они должны утилизировать в организме хозяина при развитии инфекционного процесса. Сорбируя из среды железо, бактерии приобретают способность лучше противостоять неблагоприятным факторам, а также получают преимущества в конкурентной борьбе [10].

Литература

1. *Ahazamora R., O' Mahony F., Hervey B. Y.*, Sterolid, 2011, 76, P.861-876.
2. *Бондаренко В. М., Рябченко Е. В.*, ЖМЭИ, 2013, N 2, С. 112-120.
3. *Willis C. L.*, *Toxicol. Pathol.*, 2011, 39(1), P. 172-185
4. *Поздеев О. К., Покровский В. И.* "Методические указания по микробиологической диагностике заболеваний, вызванных энтеробактериями". М. 1984.
5. *Брюзова В. И., Боровягин В.А. и др.*- Электронно-микроскопические методы исследования биологических объектов. М. Изд-во АН СССР. 1963.
6. *Bacsoti G., Villanacci V.*, *Gastroenterology*, 2007, 18(30), P. 4035-4041
7. *Бондаренко В. М., Рябченко Е. В.*, ЖМЭИ, 2011, N6, С. 101-106.
8. *Мавзютов А.Р., Бондаренко В. М.* – ЖМЭИ. 2007. N1, С. 89-97
9. *Бухарин О. В., Стадников А. А., Усвятцов Б. Я.* – ЖМЭИ. 2006. N4 С. 25 -28.
10. *Будихина А. С., Михайлова Н. А., Биткова Е. Е., Хватов В. Б.* – ЖМЭИ. 2007. N2, С. 53-57.

Биол. журн. Армении, 1 (69), 2017

УДК 577.152.353:615.214

МОДУЛИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ КОКТЕЙЛЯ СЕЛЕКТИВНЫХ ШТАММОВ ПРОБИОТИКОВ НА ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ СДВИГИ В ДИНАМИКЕ ДЕКСАМФЕТАМИН-ИНДУЦИРОВАННОГО БИПОЛЯРНОГО РАССТРОЙСТВА.

**Н.Х. АЛЧУДЖЯН, А.А. АГАБАБОВА, Н.О. МОВСЕСЯН,
М.Р. ОГАННИСЯН, А.М. АКОПЯН, О.А. МОВСЕСЯН, Г.А. ГЕВОРКЯН**

*Институт биохимии им. Г. Бунятыана НАН РА,
alchujyan@mail.ru*

Впервые при экспериментальном биполярном расстройстве (БР) показано терапевтическое действие смеси селективных штаммов пробиотиков, обладающих нейроактивным, антигрибковым и иммуностимулирующим воздействием. Их предварительное введение крысам в течение 2 недель до инъекций дексамфетамин (АМРН) и далее 24 дня параллельно с ним, восстанавливало микробиоту и поведенческие характеристики, подавляло процессы перекисного окисления липидов и снижало субклеточную активность изоформ аргиназы, в

отделах кортиколимбической системы, в течение 21 дня после AMPH-индуцированного БР.

Аргиназа, биполярное расстройство, дексамфетамин, кортиколимбическая система, митохондрии, перекисное окисление липидов, пробиотики, цитоплазма.

We show for the first time the therapeutic effects of the probiotic selective strains with neuroactive, antifungal and immune-stimulatory activity following experimental bipolar disorder (BD). Administration of this composition 2 weeks before and 24 days parallel with dexamphetamine (AMPH) injections restore microbiota and behavioral characteristics with a concomitant inhibition of both lipid peroxidation processes and arginase intracellular activity in the regions of corticolimbic system for 21 days after AMPH-induced BD

Arginase, bipolar disorder, corticolimbic system, cytoplasm, dexamphetamine, lipid peroxidation, mitochondria, probiotics .

Նյարդային, հակասնկային և իմունիտետային ակտիվությամբ օժտված պրոբիոտիկների խառնուրդի թերապևտիկ ազդեցությունը առաջին անգամ ցուցաբերվել է փորձարարական երկբևեռ խանգարման (ԵԽ) ժամանակ: Նշված խառնուրդի ներմուծումը դեքսամֆետամինի (AMPH) ներարկումներից 2 շաբաթ առաջ և 24 օր AMPH-ին զուգահեռ կարգավորում է կենդանիների միկրոբիոտան և վարքային բնութագիրը ու միաժամանակ երկարատև արգելակում է լիպիդների գերօքսիդացման գործընթացները և արգինազի ներքջային ակտիվությունը գլխուղեղի կեղևալիմբիական համակարգի բաժիններում AMPH-մակածված ԵԽ առաջացումից 21 օր հետո:

Արգինազ, քջապլագմա, դեքսամֆետամին, երկբևեռ խանգարում, լիպիդների գերօքսիդացում, կեղևալիմբիական համակարգ, միտոքոնդրիումներ, պրոբիոտիկներ

Исследования последних лет свидетельствуют о критическом влиянии микробиоты на психическое состояние и поведение хозяина [17]. Сообщалось о нарушениях микробиоты и активировании оппортунистических микробов при биполярных расстройствах (БР) и шизофрении [10]. При экспериментальном БР нами также было выявлено подавление роста облигатной микрофлоры, обильное разрастание *Candida albicans*, и манифестация *Staphylococcus aureus* и гемолитической *E. coli* [2]. Введение селективных штаммов пробиотиков, иммобилизованных на цеолите, препятствовали нарушению когнитивных функций и развитию депрессивоподобного состояния у стрессированных крыс [6]. В данной работе изучено влияние смеси отобранных пробиотиков в кортиколимбической системе в динамике экспериментального БР.

Материал и методы

Моделирование БР. Эксперименты проводили на половозрелых 2- 3-месячных белых крысах-самцах линии Вистар массой 120-150 г, которые ежедневно получали однократную внутримышечную инъекцию 0.2 мл *d*-амфетамин сульфата (дексамфетамин, AMPH) (Sigma, St. Louis, Mo.) (2-6 мг/кг массы тела, 18 инъекций) [11, 22]. Животные были разделены на группы по 12 в каждой: контрольная - интактные крысы, и опытные, которых исследовали сразу и через одну, две и три недели после прекращения введения AMPH, крысы, получавшие per os 1 мл смеси пробиотиков (6×10^9 КОЕ/мл) в течение 2 недель до инъекций AMPH, далее параллельно с AMPH и исследуемые в те же сроки.

Штаммы пробиотиков. Коммерчески доступный порошок, содержащий живые бактерии *E. coli* штамм M17, *Lactobacillus salivarius* штамм B-7701, *L. Rhamnosus* штамм ВКПМ В-6778 (VITAMAX-E, LTD Co, Yerevan RA), *L. plantarum* штамм ЦМПМ В-2353, *L. acidophilus* штамм ИНМИА 9602 (РЦДМ), и *Bifidobacterium bifidum* ВКПМ штамм АС-1666, регидратировали до 10^9 КОЕ/мл в стерильном 0,85% NaCl и культивировали в анаэробных условиях при 37°C в MRS среде.

Поведение животных оценивали в тестах “открытое поле” (ОП) и “приподнятый крестообразный лабиринт” (ПКЛ) [1, 5, 9].

Забор биологического материала. После тестирования на поведенческую активность, крыс декапитировали, забирали кровь и извлекали структуры мозга. Каждое животное вскрывалось в асептических условиях и образцы кала из нижней части кишки, кровь, полученная после декапитации, и смывы с мозга забирались для идентификации микроорганизмов установленными процедурами [4].

Выделение цитоплазматической и митохондриальной фракций структур мозга осуществляли методом дифференциального центрифугирования [3]

Активность аргиназы определяли по аргинин-зависимому образованию орнитина (в течение 1 ч при 37 °C) в реакционной смеси: 20 mM HEPES буфер pH 7.4 содержащем 2 mM дитиотреитол, 0.05 M $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ и 0.2 M L-аргинин, и выражали в мкмоль L-орнитина / мг белка / ч [15].

Содержание белка определяли методом Лоури [19].

Статистика. Достоверность различий оценивали на основе параметрического однофакторного дисперсионного анализа (one-way Anova) и последующим постдисперсионным анализом Холм-Сидака с помощью пакета программ SigmaStat 3.5

Результаты и обсуждение

Для имитации БР человека молодым самцам крыс ежедневно в течение 24 дней вводили возрастающие нетоксические дозы АМРН, которые вызывают циклические изменения поведенческих характеристик [21]. С целью воздействия на весь комплекс изменений, выявленных при экспериментальном БР использовали смесь пробиотиков: психобиотики *L. Rhamnosus* и *Bifidobacterium bifidum* [7, 25], обладающие противогрибковым и иммуностимулирующим действием *L. salivarius*, *L. plantarum* и *L. acidophilus*, [13] и *E. coli*, основной конкурент условно-патогенной микрофлоры [14, 18]. Обработка пробиотиками подавляла АМРН-индуцированные маниакальные проявления, нормализовало микробиоту, и препятствовала развитию гистопатологических изменений в отделах кортиколимбической системы мозга, которые при отсутствии лечения наблюдались и по истечении трех недель после прекращения инъекций дексамфетамина [2]. Введение коктейля пробиотиков регион-специфически подавляло процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) сразу по окончании курса инъекций АМРН и в постамфетаминный период (рис. 1).

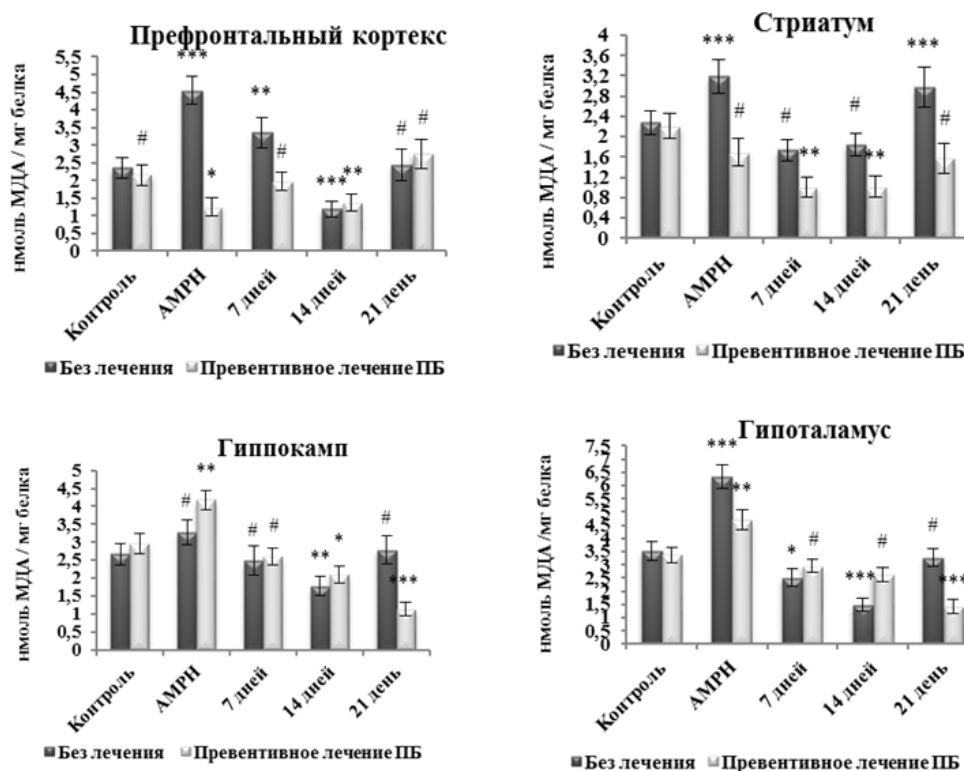


Рис. 1. Влияние композиции пробиотиков (ПБ) на содержание малонового диальдегида (МДА) в отделах кортиколимбической системы в динамике БР. Здесь и далее результаты представлены в виде $M \pm SEM$, $n=12$, достоверность (p) различий по сравнению с контролем представлена обозначениями: # $p>0.05$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

Благотворное действие пробиотиков отчасти обусловлено купированием ими свободнорадикального окисления вовлеченного в этиопатогенез БР [23]. Ингибированием ПОЛ можно объяснить выявленное нами модулирующее влияние пробиотиков на активность цитоплазматического и митохондриального изоферментов аргиназы (АРГ1 и АРГ2, соответственно), которые лимитируют содержание аргинина, расщепляя его на орнитин и мочевину. Отметим, что АРГ1 участвует в путях синтеза из орнитина пролина или глутамата, а АРГ2 направляет метаболизм в сторону синтеза путресцина и далее полиаминов, вовлеченных в механизмы БР и шизофрении [8, 24].

На рис. 2-5 представлена картина динамических изменений аргиназной активности в системе цитоплазма-митохондрии при АМРН-индуцированном БР и впервые показано модулирующее времязависимое влияние превентивного и последовательного лечения коктейлем пробиотиков.

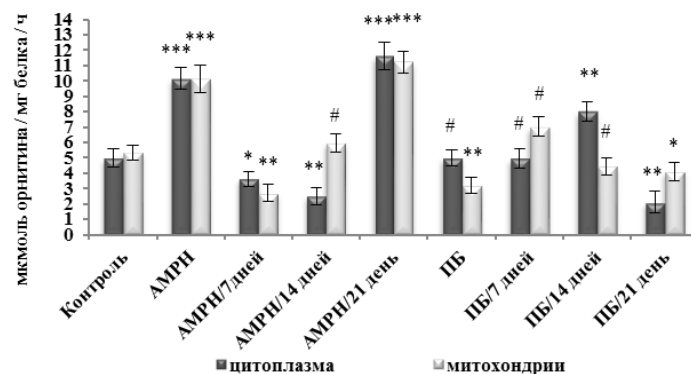


Рис. 2. Влияние композиции пробиотиков (ПБ) на динамику сдвигов субклеточной активности аргиназы префронтального кортекса при БР.

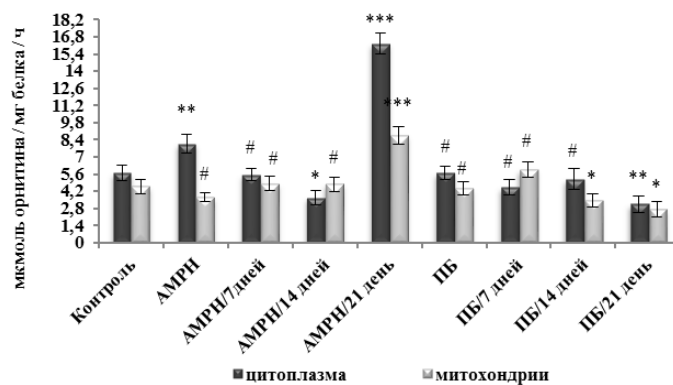


Рис. 3. Влияние композиции пробиотиков (ПБ) на динамику сдвигов субклеточной активности аргиназы стриатума при БР

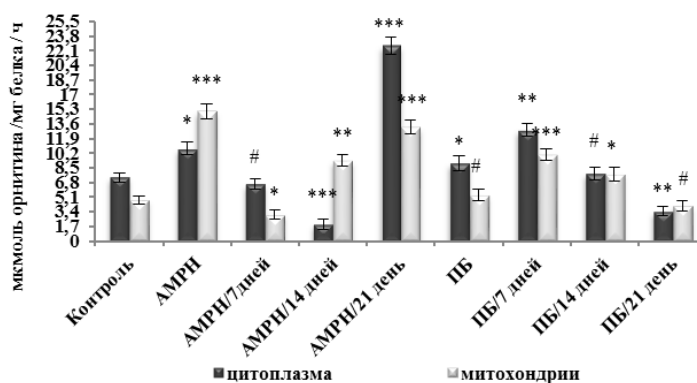


Рис. 4. Влияние композиции пробиотиков (ПБ) на динамику сдвигов субклеточной активности аргиназы гиппокампа при БР

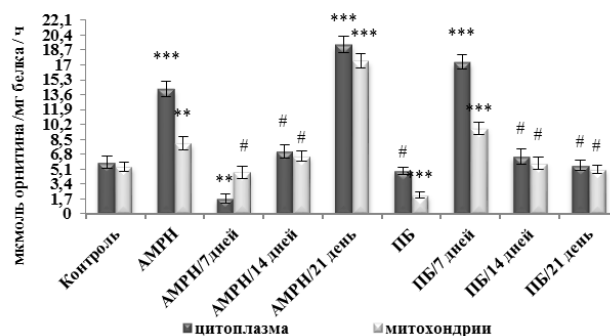


Рис. 5. Влияние композиции пробиотиков (ПБ) на динамику сдвигов субклеточной активности аргиназы гипоталамуса при БР.

Активирование процессов ПОЛ свидетельствует о стимулировании свободно-радикальных процессов с выбросом супероксид-аниона и H_2O_2 , вызывающих повышение содержания мРНК АРГ1 и возрастание ее активности [20]. АРГ1 может также индуцироваться окисленными и ацетилированными липопротеинами [12]. Таким образом, окислительный стресс при БР может являться одной из причин стимулирования аргиназы.

Аргинин оказывает нейропротекторное действие, препятствуя развитию отека мозга (в кортексе, стриатуме и пр.), и подавляя *in vivo* глутамат-индуцированную нейрональную активность (вентро-медиальный гипоталамус) [16]. Не исключено, что нормализация пробиотиками субклеточной активности изоформ аргиназы влияет на содержание аргинина и корректирует гистопатологическую картины в структурах мозга, поскольку пробиотики препятствовали образованию отеков, пролиферации и появлению атипичных клеток, которые наблюдались при экспериментальном БР (статья в печати).

Полученные результаты позволяют осмыслить молекулярные механизмы воздействия пробиотиков и открывают перспективу для клинических исследований в целях их использования для профилактики, терапии и предотвращения рецидивов БР.

Литература

1. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М. 1991, 399 с.
2. Геворкян Г.А., Акопян А.М., Мовсесян О.А., Агабабова А.А. Микробиота крыс под воздействием амфетамина. Доклады НАН РА, 2016, т. 116, (3), с. 321-326.
3. Дижее Г.П., Ещенко Н.Д., Дижее А.А., Красовская И.Е. Введение в технику биохимического эксперимента. СПб., 2003, 86 с.
4. Методические указания по микробиологической диагностике заболеваний, вызванных энтеробактериями. (Покровский В.И. ред.) М., 1984.
5. Augustsson H., Meyerson B. Exploration and risk assessment: a comparative study of male house mice (*Mus musculus*) and two laboratory strains. *Physiol. Behav.*, 2004, v. 81 (4), p. 685-698.
6. Barseghyan K.A., Sargsyan H.H., Madoyan R.A., Alchujyan N.Kh., Guevorkian A.G., Movsesyan N.H., Hayrapetyan H.L., Hovhannisyan M.R., Khachatryan H.F., Barseghyan V.A., Kevorkian G.A. Combined effect of lactic acid bacteria and modified natural mineral composite substances on the chronic stress-induced depression and cognitive deficit. *J. Applied Biochem. Photon*, 2013, v. 106, p. 157-169.
7. Bravo J.A., Julio-Pieper M., Forsythe P., Kunze W., Dinan T.G., Bienenstock J., Cryan J.F. Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor

-
- expression in a mouse via the vagus nerve. *Curr Opin Pharmacol.*, 2012, v. 12 (6), p. 667-672.
8. *Cederbaum S.D., Yu H., Grody W.W., Kern R.M., Yoo P.*, Arginases I and II: do their functions overlap? *Mol. Genet. Metab.*, 2004, v. 81 (Suppl 1), p. S38-S44.
 9. *Costall B., Nylor R., Olley J.* The substantia nigra and stereotyped behavior. *Eur. J. Pharmacol.*, 1972, v. 18, p. 95-106.
 10. *Dickerson F., Severance E., Yolken R.* The microbiome, immunity, and schizophrenia and bipolar disorder. *Brain Behav. Immun.*, 2017, v. 62, p. 46-52.
 11. *Frey B.N., Valvassori S.S., Réus G.Z., Martins M.R., Petronilho F.C., Bardini K., Dal-Pizzol F., Kapczinski F., Quevedo J.* Effects of lithium and valproate on amphetamine-induced oxidative stress generation in an animal model of mania. *J. Psychiatry Neurosci.*, 2006, v. 31 (5), p. 326-332.
 12. *Gallardo-Soler A., Gómez-Nieto C., Campo M.L., Marathe C., Tontonoz P., Castrillo A., Corraliza I.* Arginase I induction by modified lipoproteins in macrophages: a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma/delta-mediated effect that links lipid metabolism and immunity. *Mol. Endocrinol.*, 2008, v. 22 (6), p. 1394-1402.
 13. *Hronek M., Vachtlova D., Kudlackova Z., Jilek P.* Antifungal effect in selected natural compounds and probiotics and their possible use in prophylaxis of vulvovaginitis. *Ceska Gynekology*, 2005, v. 70 (5), p. 395-399.
 14. *Hudault S., Guignot J., Servin A.L.* Escherichia coli strains colonising the gastrointestinal tract protect germfree mice against Salmonella typhimurium infection. *Gut*, 2001, v. 49 (1), p. 47-55.
 15. *Iyama E.W., Asakura T., Woods G.W.* A colorimetric microplate assay method for high throughput analysis of arginase activity in vitro. *Anal. Biochem.*, 2008, v. 383 (2), p. 332-334.
 16. *Kondoh T., Kameishi M., Mallick H.N., Ono T., Torii K.* Lysine and arginine reduce the effects of cerebral ischemic insults and inhibit glutamate-induced neuronal activity in rats. *Front. Integr. Neurosci.*, 2010, v. 4, p. 18-23.
 17. *Leonard B., Maes M.* Mechanistic explanations how cell-mediated immune activation, inflammation and oxidative and nitrosative stress pathways and their sequels and concomitants play a role in the pathophysiology of unipolar depression. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 2012, v. 36 (2), p. 764-785.
 18. *Lodinová-Zádníková R., Cukrowska B., Tlaskalova-Hogenova H.* Oral administration of probiotic Escherichia coli after birth reduces frequency of allergies and repeated infections later in life (after 10 and 20 years). *Inter. Arch. Allerg. Immunol.*, 2003, v. 131 (3), p. 209-211.
 19. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, v. 193, p. 265-275.
 20. *Matthiesen S., Lindemann D., Warnken M., Juergens U.R., Racké K.* Inhibition of NADPH oxidase by apocynin inhibits lipopolysaccharide induced up-regulation of arginase in rat alveolar macrophages. *Eur. J. Pharmacol.*, 2008, v. 579 (1-3), p. 403-410.
 21. *Movsesyan H.A., Alchujyan N.Kh., Aghababova A.A., Movsesyan N.H., Hovhannisyan M.R., Hakobyan A.M., Hovsepyan I.V., Khachatryan H.F., Kevorkian G.A.* Effects of d-amphetamine on the regional activity of arginase isoforms in the rat corticolimbic brain. *Ученые записки ЕГУ, Химия и Биология/ Proceedings of the YSU, Chemistry and biology*, 2016, v. 3, p. 40-47.
 22. *Robinson T.E., Camp D.M.* Long-lasting effects of escalating doses of d-amphetamine on brain monoamines, amphetamine-induced stereotyped behavior and spontaneous nocturnal locomotion. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 1987, v. 26 (4), p. 821-827.
 23. *Siwek M., Sowa-Kucma M., Styczen K., Misztak P., Szewczyk B., Topor-Madry R., Nowak G., Dudek D., Rybakowski J.K.* Thiobarbituric acid-reactive substances: markers of an acute episode and a late stage of bipolar disorder. *Neuropsychobiology*, 2016, v. 73 (2), p. 116-122.
 24. *Svinarev V.I., Syatkin S.P., Frolov V.A., Zaletok S., Golomazova K.A., Shevchenko A.A., Fedoronchuk T.V., Neborak K., Natroshvili N.* The role of polyamines in etiopathogenesis of schizophrenia. *Springer Wien New York. Amino Acids*, 2007, v. 33, p. 43-48.
 25. *Urita Y., Goto M., Watanabe T., Matsuzaki M., Gomi A., Kano M., Miyazaki K., Kaneko H.* Continuous consumption of fermented milk containing Bifidobacterium bifidum YIT 10347 improves gastrointestinal and psychological symptoms in patients with functional gastrointestinal disorders. *Biosci. Microbiota Food Health*, 2015, v. 34 (2), p. 37-44.

ВЛИЯНИЕ РЕЖИМА ОСВЕЩЕНИЯ НА ВЫДЕЛЕНИЕ ВОДОРОДА ФОТОТРОФНЫМИ ОРГАНИЗМАМИ

Л.С. ГАБРИЕЛЯН

Ереванский гос. университет, кафедра биохимии, микробиологии и биотехнологии
lgabrielyan@ysu.am

Исследовано действие режима освещения на выделение водорода (H_2) зеленой микроводорослью *Parachlorella kessleri* PA-002 и пурпурной бактерией *Rhodobacter sphaeroides* MDC6521. Выявлено, что *P. kessleri* и *R. sphaeroides* не способны к выделению H_2 в темноте. Когда культуры *R. sphaeroides* освещались через 24 ч темнового периода, выход H_2 возрастал в 2.5 раза, по сравнению с контрольным образцом; тогда как выделение H_2 *P. kessleri* увеличивалось в 1.5 раза при темновой инкубации микроводорослей после предварительного освещения в течение 24 ч. Это увеличение выхода H_2 возможно за счет активации соответствующих ферментов и создания анаэробных условий. Полученные результаты важны для выявления механизмов выделения H_2 у фототрофов, а также для дальнейшего совершенствования водородной биотехнологии.

Режим освещения – выделение водорода – *Rhodobacter sphaeroides* – *Parachlorella kessleri*

Ուսումնասիրվել է լուսավորության ռեժիմների ազդեցությունը *Parachlorella kessleri* PA-002 կանաչ միկրոզոդիմոնում և *Rhodobacter sphaeroides* MDC6521 ծիրանագույն բակտերիայում ջրածնի (H_2) արտադրության վրա: Ցույց է տրվել, որ *P. kessleri* և *R. sphaeroides* չեն արտադրում H_2 մթնային պայմաններում: Երբ *R. sphaeroides*-ը լուսավորվել է 24 ժ մթնային փուլից հետո, H_2 -ի ելքը աճել է 2.5 անգամ, ստուգիչի համեմատությամբ: Սակայն *P. kessleri*-ում H_2 -ի արտադրությունը խթանվել է 1.5 անգամ, երբ կուլտուրան 24 ժ լուսավորությունից հետո տեղափոխվել է մթնային պայմաններ: H_2 -ի արտադրության խթանումը կարող է պայմանավորված լինել համապատասխան ֆերմենտների ակտիվացմամբ և անաէրոբ պայմանների ստեղծմամբ: Ստացված տվյալները կարևոր են ֆոտոտրոֆներում H_2 -ի արտադրության մեխանիզմների պարզաբանման, ինչպես նաև ջրածնային կենսատեխնոլոգիայի բարելավման համար:

Լուսավորությունը ռեժիմ – ջրածնի արտադրություն – *Rhodobacter sphaeroides* – *Parachlorella kessleri*

The effect of the lighting regime on the hydrogen (H_2) production by green microalgae *Parachlorella kessleri* PA-002 and purple bacterium *Rhodobacter sphaeroides* MDC6521 has been investigated. It has been shown that *P. kessleri* and *R. sphaeroides* don't produce H_2 at the darkness. When *R. sphaeroides* culture was illuminated after 24 h of dark period, the H_2 yield was increased 2.5 fold in comparison with the control sample; whereas the H_2 production by *P. kessleri* was enhanced by 1.5 fold during the dark incubation of microalgae after pre-illumination during 24 h. H_2 yield increase is possible due to activation of the corresponding enzymes and the creation of anaerobic conditions. The results obtained are important for understanding of H_2 production mechanisms in phototrophs, as well as for further improvement of hydrogen biotechnology.

Lighting regime – hydrogen production – *Rhodobacter sphaeroides* – *Parachlorella kessleri*

В настоящее время одним из актуальных направлений водородной биотехнологии и биоэнергетики является поиск микроорганизмов, способных к эффективному выделению молекулярного водорода (H_2), и создание оптимальных условий, обеспечивающих высокие выход и скорость продуцирования H_2 [2, 3, 11]. Как известно, H_2 является одним из наиболее перспективных альтернативных источников экологически чистой энергии, и может сыграть значительную роль в энергетических технологиях будущего.

Биологическое выделение H_2 имеет ряд преимуществ по сравнению с другими способами получения водорода, одно из которых – низкие энергетические затраты, особенно при производстве H_2 организмами, использующими солнечный свет в качестве источника энергии. Светозависимое выделение H_2 осуществляется тремя группами фотосинтезирующих организмов – зелеными водорослями и цианобактериями в процессе прямого и непрямого биофотолиза, и пурпурными бактериями – в процессе фотоброжения органических соединений [2-4, 9, 11].

В основе светозависимого выделения H_2 фототрофными организмами лежит процесс фотосинтеза. В ходе фотофизических и фотохимических процессов в фототрофах за счет солнечной энергии при определенных условиях выделяется H_2 [2-4, 11]. Данный процесс у пурпурных бактерий катализируется ферментом нитрогеназой с использованием АТФ, тогда как у зеленых микроводорослей выделение H_2 обусловлено деятельностью другого фермента – гидрогеназы [4, 9].

Выход H_2 зависит от ряда факторов: вида и возраста культуры, от природы использованных субстратов, а также от анаэробных условий роста и температуры, pH, и наличия макро- и микроэлементов [2-4, 9-12].

Большое влияние на выделение биоводорода оказывают условия освещения. Интенсивность света – важный фактор среды, влияющий на рост, выход и скорость выделения H_2 фотосинтезирующими организмами [7, 10, 12]. Умеренная интенсивность света обеспечивает фототрофов восстановленными эквивалентами и АТФ посредством мембранно-связанного электронного транспорта, который участвует в выделении H_2 , а также активирует водород-производящие ферменты – нитрогеназу и гидрогеназу [4, 7, 12]. С этой точки зрения актуальным является оптимизация условий культивирования микроорганизмов, в частности, выбор режима освещения для увеличения выхода H_2 .

Целью настоящей работы было исследование влияния режима освещения на окислительно-восстановительный потенциал (ОВП) и выделение H_2 зеленой микроводорослью *Paraclorella kessleri* PA-002 и пурпурной бактерией *R. sphaeroides* MDC6521.

Материалы и методы

В работе использовались пурпурная несерная бактерия *R. sphaeroides*, шт. MDC6521, выделенная из минерального источника Арзни в Армении, и зеленая микроводоросль *P. kessleri* PA-002 (Центр депонирования микроорганизмов НАН Армении, Ереван, Армения, WDCM803). *R. sphaeroides* выращивали в анаэробных условиях на среде Ормерода, а *P. kessleri* – в аэробных условиях на среде Тамия, в термостате при pH 7.5 ± 0.2 , температуре 30 ± 0.2 °C и освещении 2000 люкс [1, 5, 6]. Для освещения использовали галогеновые лампы (мощность – 60 Вт). Интенсивность света измеряли люксметром LM37 (Carl Roth, Germany). Для исследования выделения H_2 *P. kessleri* суспензию микроводоросли в стационарной фазе роста выделяли центрифугированием и суспендировали в среде TAP (pH 7.5).

Рост *R. sphaeroides* и *P. kessleri* контролировали путем измерения оптической плотности (ОП) суспензии на спектрофотометре Spectro UV-Vis Auto (Labomed, США) при длине волны 660 и 680 нм, соответственно [1, 5, 6]. pH среды определяли с помощью чувствительного pH-метра с соответствующим селективным электродом типа HJ1131B (Hanna Instruments, Португалия) и регулировали с помощью 0.1 М NaOH и HCl [5, 6].

Величину окислительно-восстановительного потенциала (ОВП) определяли с помощью цифровых иономеров И-160 МП (Гомельский завод измерительных приборов, г. Гомель, Беларусь) с использованием платинового (ЭПВ-01) и титан-силикатного (ЭО-21) электродов, как описано ранее [5, 6].

Выход H_2 рассчитывали по изменению величины ОВП и выражали в ммоль H_2 /л культуры как описано ранее [5, 6]. Выделение H_2 также подтверждали химическим методом как описано [5, 8].

В работе использовали реактивы аналитической чистоты (Carl Roth GmbH, Германия, Sigma Aldrich, США). Приводятся средние данные из 3 независимых экспериментов со стандартной ошибкой [5, 6].

Результаты и обсуждение

Применялись четыре режима культивирования: первая культура подвергалась непрерывному освещению в течение 72 ч и служила в качестве контроля; вторая культура находилась в темновых условиях в течение 72 ч; третья культура освещалась в течение 24 ч, затем помещалась в темновые условия; и наконец четвертая – освещалась через 24 ч темнового периода.

Для выяснения механизмов действия режима освещения на *P. kessleri* и *R. sphaeroides* исследовали изменения ОВП и pH среды при росте организмов в различных условиях освещения. Как известно, ОВП является важным фактором, определяющим анаэробный рост микроорганизмов, сопровождающийся падением ОВП от положительных величин до отрицательных [6]. Падение ОВП указывает на восстановительные процессы, связанные с формированием конечных продуктов брожения, что является типичным для метаболических процессов во время роста клеток в анаэробных условиях [6, 11]. Связь между изменением ОВП и выделением H_2 была показана ранее для *R. sphaeroides* [5, 6].

Рост *P. kessleri* в течение 72 ч непрерывного освещения сопровождался падением величины ОВП от положительных (235 ± 10 мВ) до отрицательных значений (-480 ± 20 мВ) (Рис. 1А). Такое падение ОВП может свидетельствовать не только о повышении восстановительных процессов, но и о фотовыделении H_2 [5, 6]. ОВП культуры, находящейся в темновых условиях, не подвергался резким изменениям (не показано). ОВП *P. kessleri*, которая находилась в темноте после 24 ч освещения, понижался до -535 ± 20 мВ (Рис. 1А). Падение ОВП может быть связано с постепенным уменьшением в темновых условиях интенсивности фотосинтеза и скорости продуцирования O_2 , а также с поглощением в процессе дыхания всего O_2 , что привело к созданию анаэробных условий и к синтезу H_2 . Однако при освещении культуры *P. kessleri* после 24 ч темновой инкубации величина ОВП составляла -415 ± 10 мВ (Рис. 1А). Такое изменение ОВП может быть связано с включением фотосинтеза и выделением O_2 при освещении.

Рост контрольных клеток *R. sphaeroides* сопровождался падением величины ОВП от положительных (120 ± 10 мВ) в начале лаг-фазы роста до низких отрицательных значений (-550 ± 20 мВ) при переходе в стационарную фазу (Рис. 1А). Такое падение ОВП свидетельствует об усилении восстановительных процессов, что характерно для бактериального метаболизма в анаэробных условиях, а также о выделении H_2 [5, 6]. ОВП бактерии, находящейся в темновых условиях, изменялся незначительно (не показано). При освещении культуры в течение 24 ч и применении темновых условий, величина ОВП составляла -400 ± 20 мВ, тогда как освещение культуры *R. sphaeroides* через 24 ч темновой инкубации приводило к резкому падению ОВП до -610 ± 20 мВ (Рис. 1А).

Как известно, ОВП зависит от pH среды, который является одним из важных показателей роста микроорганизмов в разных условиях среды [5, 6]. При различных режимах освещения наблюдался рост pH, при этом pH среды *P. kessleri* не подвергался резким изменениям, тогда как pH среды *R. sphaeroides* возрастал от 7.5 (начальное значение pH) до 9.0-9.2 при непрерывном освещении и при режиме 24 ч в

темноте/48 ч освещения, соответственно (рис. 1Б). Изменение pH связано с образованием различных продуктов метаболизма, в том числе и H_2 [5, 6].

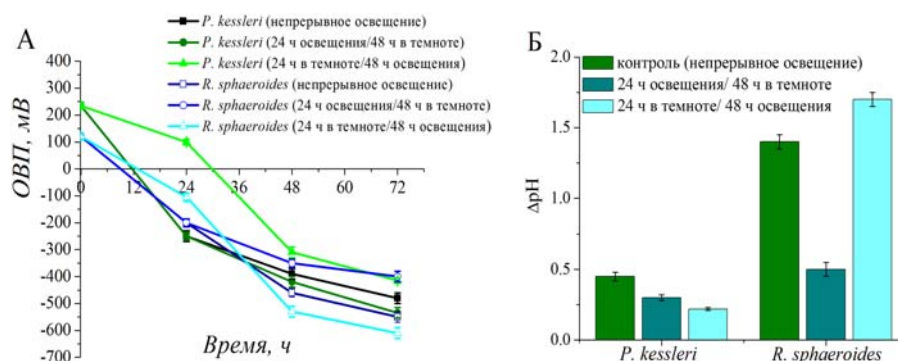


Рис. 1. Изменение ОВП (А) и pH (Б) среды *P. kessleri* PA-002 и *R. sphaeroides* MDC6521 при различных режимах освещения (ΔpH определяли как разницу между начальным и конечным значениями pH).

Как видно из табл. 1, при непрерывном освещении культуры как зеленой микроводоросли, так и пурпурной бактерии, выделяли H_2 , при этом выход H_2 у *R. sphaeroides* в 1.6 раз превышал выделение H_2 *P. kessleri*. Как оказалось, *P. kessleri* и *R. sphaeroides* не способны к выделению H_2 в темноте (табл. 1). Выделение водорода *P. kessleri* возрастало в 1.5 раза, по сравнению с контролем, в темновых условиях после предварительного освещения в течение 24 ч. Это увеличение выхода H_2 возможно за счет темновой анаэробной адаптации микроводорослей, при которой активируется гидрогеназа – фермент, обеспечивающий образование H_2 [9, 10]. Однако когда *P. kessleri* освещалась через 24 ч темновой инкубации, то выход H_2 подавлялся приблизительно в 2 раза, по сравнению с контролем (табл. 1). Снижение выхода H_2 может быть связано с включением процесса фотосинтеза и продуцированием O_2 , подавляющего активность гидрогеназы.

Когда культура *R. sphaeroides* освещалась через 24 ч темновой инкубации, выход H_2 возрастал в 2.5 раза, по сравнению с контрольным образцом (табл. 1). Это увеличение выхода H_2 возможно за счет активации нитрогеназы и синтеза АТФ, необходимого для выделения H_2 в процессе фотоброжения. Катализируемое нитрогеназой выделение H_2 требует поступление электронов от восстановленного ферредоксина, а также больших количеств АТФ, т.е. является энергозависимым процессом. При освещении культуры в течение 24 ч и переносе в темновые условия, выделение H_2 бактерией *R. sphaeroides* подавлялось в 3 раза, по сравнению с контрольным образцом (табл. 1). Это может быть обусловлено тем, что при росте в темновых условиях наблюдается недостаток световой энергии, необходимой для синтеза АТФ и выделения H_2 [12].

Табл. 1. Влияние режима освещения на выделение H_2 зеленой микроводорослью *P. kessleri* PA-002 и пурпурной бактерией *R. sphaeroides* MDC6521.

		Выход H_2^* , ммоль/л		
Культура	Контроль	72 ч в	24 ч освещения/	24 ч в темноте/
	(непрерывное	темноте	48 ч в темноте	48 ч освещения

	освещение)			
<i>P. kessleri</i>	1.40±0.06	–	2.14±0.10	0.75±0.05
<i>R. sphaeroides</i>	2.20 ± 0.06	–	0.73±0.05	5.50±0.10

*Выход H₂ определяли по изменению ОВП.

Минус (–) указывает на отсутствие выделения H₂.

Таким образом, оптимизация режима освещения может привести к увеличению выделения H₂ фототрофными организмами. Полученные результаты важны для выявления механизмов выделения H₂ у фототрофов, а также для дальнейшего совершенствования водородной биотехнологии.

Автор выражает благодарность член-кор. НАН РА, д.б.н., проф. А. Трчуняну за помощь в интерпретации полученных результатов. Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного комитета по науке Министерства образования и науки РА, грант №15T-1F123.

Литература

1. Сиренко Л.А., Сакевич А.И., Осипов Л.Ф., Лукина Л.Ф., Кузьменко М.И. и др. Методы физиолого-биохимического исследования микроводорослей в гидробиологической практике. Киев: Изд-во "Наукова Думка", 247 с., 1975.
2. Цыганков А.А., Хуснутдинова А.Н. Участие H₂ в метаболизме пурпурных бактерий и перспективы практического использования. Микробиол., 84, 3–26, 2015.
3. Allakhverdiev S.I., Thavasi V., Kreslavski V.D., Zharmukhamedov S.K., Klimov V.V. et al. Photosynthetic hydrogen production. J. Photochem. Photobiol., 11, 101–113, 2010.
4. Gabrielyan L., Trchounian A. Purple bacteria and cyanobacteria as potential producers of molecular hydrogen: An electrochemical and bioenergetic approach, in: Trchounian A. (Ed.) *Bacterial Membranes*. Kerala (India): Research Signpost, p. 233–273, 2009.
5. Gabrielyan L., Hakobyan L., Trchounian A. Comparative effects of Ni(II) and Cu(II) ions and their combinations on redox potential and hydrogen photoproduction by *Rhodobacter sphaeroides*. J. Photochem. Photobiol., 164, 271–275, 2016.
6. Gabrielyan L., Sargsyan H., Hakobyan L., Trchounian A. Regulation of hydrogen photoproduction in *Rhodobacter sphaeroides* batch culture by external oxidizers and reducers. Appl. Energy, 131, 20–25, 2014.
7. Lazaro C.Z., Varesche M.B.A., Silva E.L. Effect of inoculum concentration, pH, light intensity and lighting regime on hydrogen production by phototrophic microbial consortium. Ren. Energy 75, 1–7, 2015.
8. Maeda T., Wood T.K. Formate detection by potassium permanganate for enhanced hydrogen production in *Escherichia coli*. Int. J. Hydrogen Energy 33, 2409–2412, 2008.
9. McKinlay J.B., Harwood C.S. Photobiological production of hydrogen as a biofuel. Curr. Opin. Biotechnol., 21, 244–251, 2010.
10. Rashid N., Lee K., Han J-in., Gross M. Hydrogen production by immobilized *Chlorella vulgaris*: optimizing pH, carbon source and light. Bioprocess Biosyst. Eng., 36, 867–872, 2013.
11. Trchounian A. Mechanisms for hydrogen production by different bacteria during mixed-acid and photo-fermentation and perspectives of hydrogen production biotechnology. Crit. Rev. Biotechnol. 35, 103–113, 2015.
12. Uyar B., Eroglu I., Yücel M., Gündüz U., Türker L. Effect of light intensity, wavelength and illumination protocol on hydrogen production in photobioreactors. Int. J. Hydrogen Energy 32, 4670–4677, 2007.

ВЛИЯНИЕ ВИДОВ РОДА *PSEUDOMONAS* SPP. НА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ КАЧЕСТВО И БЕЗОПАСНОСТЬ ПЕРЕРАБОТАННОЙ АКВАКУЛЬТУРЫ ФОРЕЛИ В ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ УСЛОВИЯХ

ГРИГОРЯН К.М., САРГСЯН М.П.

Ереванский государственный университет, биологический факультет,
foodlab@inbox.ru

Виды рода *Pseudomonas* играют важную роль как при выращивании аквакультуры, так и при ее переработке. Ряд видов указанного рода являются возбудителями бактериозов аквакультуры форели на разных стадиях выращивания (Austin et al. 2016). Виды *P. fluorescens* и *P. aeruginosa* являются типичными представителями водных экосистем, как открытых водоемов, так и артезианской воды (Nasreen et al., 2015; Grigoryan et al., 2015). Бактерии из рода *Pseudomonas* способны размножаться и не терять жизнеспособность при температуре 5⁰С и ниже. Они могут развиваться в холодильных камерах, по всей цепочке холодильного хранения рыбной продукции (Todd and Notermans, 2011). Отдельные виды рода *Pseudomonas* являются причиной изменения качества рыбы, с ухудшением органолептических показателей. Такие изменения существенно сокращают сроки хранения продукта. (Arslan et al., 2011).

Основная цель работы – изучение видового состава бактерий, контаминирующих рабочие поверхности в процессе производства охлажденной форели; изучение влияния контактного времени испытуемого биоцида на жизнеспособность бактерий рода *Pseudomonas* spp.

Материал и методы

2.1 Отбор проб. Отбор образцов с кожных покровов рыбы и поверхностей, контактирующих с рыбой (25см²), на всех стадиях производства, проводили методом мазков. Для взятия образцов и их транспортировки в лабораторию использованы HiCulture™ Transport Swabs (w/Amies Medium w/Charcoal, MS651, HiMedia, India).

2.2. Выделение и идентификация. Для идентификации и подсчета бактерий из рода *Pseudomonas* spp. использована основа цетримидного агара (M024, HiMedia Laboratories, Mumbai, India). Для идентификации видов рода *Pseudomonas* spp. использована хромогенная среда HiFluoro *Pseudomonas* Agar Base (M1469, HiMedia Laboratories, Mumbai, India) и быстрая диагностика API 25PseudoAero.

2.3. Дезинфицирующие вещества. В представленном исследовании использован 1% водный раствор дезинфицирующего агента надуксусной кислоты промышленного производства. Часть экспериментов проведены в производственных условиях.

Производственное тестирование. Для оценки биоцидной активности 1% раствора надуксусной относительно психротрофных бактерий проводили отбор проб методом мазков каждые 30 мин: с рабочих поверхностей из нержавеющей стали в производственном цехе потрошения, включая стадии мойки и дезинфекции. Затем проводили посев на вышеуказанных селективных диагностических средах.

Результаты и обсуждение

С аквакультуры радужной форели выделено и идентифицировано 7 видов из рода *Pseudomonas* (таблица 1).

Таблица 1.
Виды рода *Pseudomonas*, изолированные из сырьевой аквакультуры форели

Виды рода <i>Pseudomonas</i>	Частота встречаемости видов <i>Pseudomonas</i> в %	
	изолированные с кожи	изолированные с жабр
<i>P. aeruginosa</i>	40	45
<i>P. anguilloseptica</i>	20	7
<i>P. stutzeri</i>	12	8
<i>P. putida</i>	35	23
<i>P. fluorescens</i>	60	47
<i>P. alcaligenes</i>	22	5
<i>P. pseudoalcaligenes</i>	6	3

Виды из рода *Pseudomonas* часто выделялись из кожных покровов, жабр форели. Таким образом, сырьевая рыба является основным источником контаминации производственного оборудования и рабочих поверхностей грамм отрицательными оксидазоположительными бактериями из рода *Pseudomonas*. Изолированные виды относятся к условно-патогенными, психротрофными бактериями. Основным их резервуаром являются водные экосистемы. Идентифицированные виды часто встречаются в образцах артезианской воды (Григорян и др., 2015). На рис. 1 представлены результаты влияния отдельных стадий производства охлажденной форели на уровень контаминации сырьевой рыбы видами рода *Pseudomonas*.

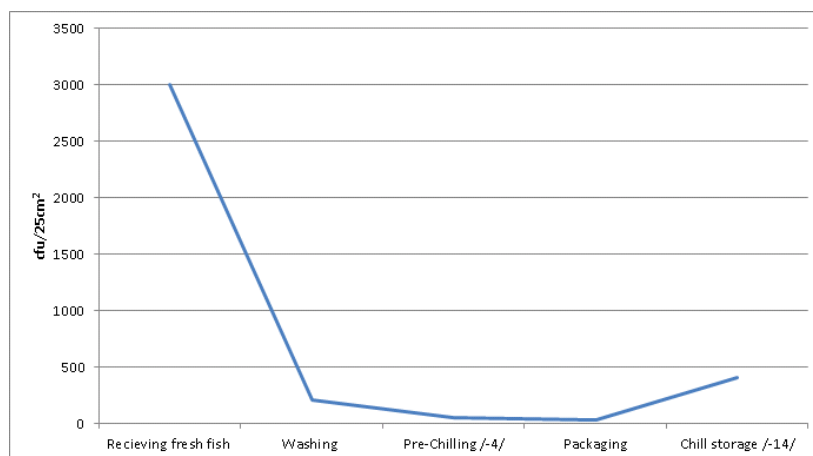


Рис.1. Динамика роста *Pseudomonas* spp. на всех стадиях производства охлажденной рыбы

В процессе мойки имеет место снижение количества бактерий из рода *Pseudomonas* spp на 1 log. В конце 12 часового хранения потрошеной рыбы при температуре -3-5°C наблюдается увеличение количества бактерий от 65 до 300 кое/25 см². При хранении охлажденной рыбы в течении 14 дней количество бактерий из рода

Pseudomonas spp достигает до 10^7 - 10^8 /25см². В процессе хранения сырьевой рыбы под слоем льда количество психротрофных бактерий, в том числе бактерий из рода *Pseudomonas* в течение 24ч может достигнуть до 10^7 кое/25см², при исходной степени контаминации порядка 10^4 кoe/см². Согласно Обемата (Obemeata et al., 2011), при аэробном хранении сырьевой рыбы под слоем льда, в течение 20 дней, при температуре -4°C, в основном, наблюдалось развитие видов из родов *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Proteus*, *Bacillus*, *Micrococcus* и *Aeromonas spp*. Авторы подчеркивают, что только виды родов *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Proteus* и *Bacillus spp*, не теряют жизнеспособность при хранении рыбы в условиях -18 °C.

Одновременно, проведена сравнительная оценка степени загрязнения рабочих поверхностей (столы, контейнеры и холодильные камеры) в процессе производства грамм отрицательными, оксидазо положительными бактериями из рода *Pseudomonas spp* (рис.2).

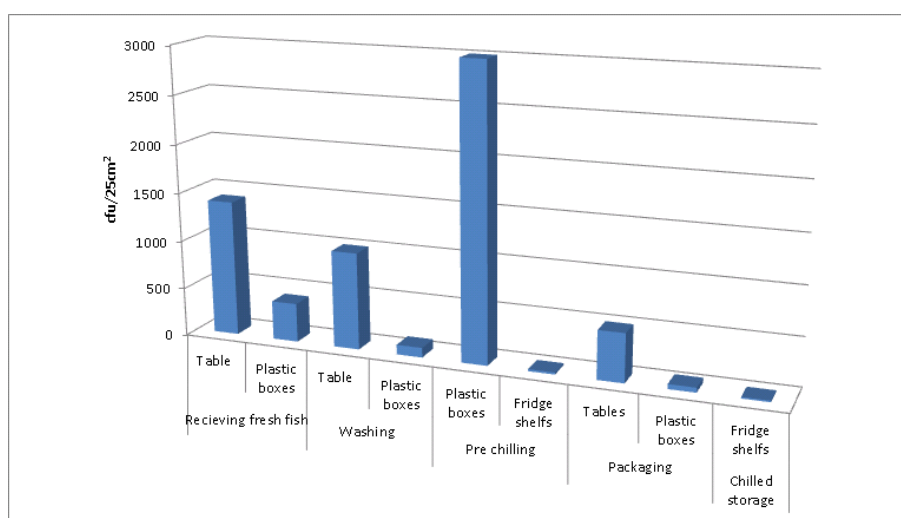


Рис. 2. Распространение бактерий рода *Pseudomonas spp.*, на рабочих поверхностях в процессе переработки рыбы

Виды рода *Pseudomonas* способны развиваться в пластиковых контейнерах и на рабочих поверхностях из нержавеющей стали. В процессе производства охлажденной рыбы, пластиковые контейнеры и поверхности из нержавеющей стали, которые тесно контактируют с рыбой, являются хорошим субстратом для образования биопленок. Образование биопленок способствует повторному загрязнению рыбы, и поверхностей, контактирующих с рыбой психротрофными бактериями. Согласно (Verran et al., 2006) микробиологический анализ биопленок, образующихся на рабочих поверхностях рыбных предприятий, показал на доминирование в их составе видов из следующих родов *Vibrio*, *Flexibacter*, and *Aeromonas*. В представленном исследовании особое внимание было обращено на изучение влияния методов очистки и дезинфекции на распространение грамм отрицательных, оксидазо положительных бактерий на рабочих поверхностях из нержавеющей стали в зоне потрошения рыбы.

Показана высокая ингибирующая активность 1% водного раствора надуксусной кислоты относительно видов *Pseudomonas spp*. Отмечается значительное снижение количества жизнеспособных клеток в течение 30 мин., от 700 кое/25см² до 50кoe/см². Однако, начиная с 60 минут, после обработки дезинфектантом, отмечается развитие жизнеспособных клеток и рост их количества до 120-150 кое/25см². 1% водный

раствор надуксусной кислоты проявляет временное ингибирование психротрофных бактерий рода *Pseudomonas spp.*, влияющих на качество охлажденной форели. В соответствии с результатами исследований Тоте (Tote et al., 2010) надуксусная кислота способна подавить рост приблизительно 98% и 99% жизнеспособных клеток *S. aureus* and *P. aeruginosa*, соответственно, только в первые минуты контактного времени. Надуксусная кислота не способна ингибировать развитие психротрофных бактерий в биофильмах. В соответствии с данными других авторов также подчеркивается, что надуксусная кислота менее эффективна относительно биофильмов в сравнении с другими дезинфектантами (Klorasik et al., 2010).

Выводы:

- Бактерии рода *Pseudomonas spp* являются одной из основных групп бактерий играющих важную роль в загрязнении охлажденной рыбы. Виды указанного рода относятся к психротрофным, грамм отрицательным, оксидазо положительным бактериям, которые обладают высокой частотой встречаемости на сырьевой рыбе, на рабочих поверхностях из нержавеющей стали, в процессе переработки и хранения в температурных пределах от +8⁰С до -13⁰С.

- Следует провести более детальные исследования по моделированию формирования биопленок с участием бактерий рода *Pseudomonas spp*, определению эффективности биоцидов относительно видов *Pseudomonas spp* в сообществе с другими видами, как в лабораторных, так и в производственных условиях.

Литература

1. Arslan, M., Sirkecioglu, N., Bayir, A., Arslan, H. and Aras, M. 2012. The influence of substitution of dietary fish oil with different vegetable oils on performance and fatty acid composition of brown trout, *Salmo trutta*. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 12: 575-58.
2. Austin B., Austin D.A. Bacterial Fish Pathogens., Springer, Switzerland, 2016, p.723.
3. Grigoryan K.M., Sargsyan M.P., Ovsepyan V.V., Badalyan G.N. Distribution of species of the genus *Pseudomonas* in artificial ponds of Armavir region in Armenia., 7th Int. Conference "Water&Fish", June 10-12, 2015, Belgrade, Serbia, p. 243-246.
4. Gudbjornsdottir B., Suikko M. L. P., Gustavsson P., Thorkelsson G., Salo S., Sjoberg A. M., Niclasen O. and Bredholt S. (2004). The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in the Nordic countries. Food Microbiology, 21, pp. 217 - 225.
5. K. Grigoryan, G. Badalyan, M. Sargsyan, A. Harutyunyan Assessment of microbiological safety of ground water used in rainbow trout farms LWT - Food Science and Technology. 58, (2014), 360-363.
6. Hamanaka D, Onishi M, Genkawa T, Tanaka F, Uchino T (2012). Effects of temperature and nutrient concentration on the structural characteristics and removal of vegetable-associated *Pseudomonas* biofilm. Food Control. 24:165-170.
7. M. Nasreen, A. Sarker, M. Malek, Md. Ansaruzzaman, M. Rahman. Prevalence and Resistance Pattern of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Surface Water. Advances in Microbiology, 2015, 5, 74-81.
8. Srey S., Jahid I. K., Ha S. D.(2013). Biofilm formation in food industries: A food safety concern. Food Control, 31(2), pp. 572 - 585.
9. Verran J. and Whitehead K. A. (2006a). Assessment of organic materials and microbial components on hygienic surfaces. Food and Bioproducts Processing, 84, pp. 260 -264.
10. Tote K., Horemans T., Vanden Berghe D., Maes L., and Cos P. (2010). Inhibitory effect of biocides on the viable masses and matrices of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Applied and Environmental Microbiology, 76(10), pp. 3135 - 3142.
11. Krolasik J., Zakowska Z., Krepska M., and Klimek L.(2010). Resistance of bacterial biofilms formed on stainless steel surface to disinfecting agent. Polish Journal of Microbiology, 59(4), pp. 281 - 287.
12. S. Stepanovic', I. C' Irkovic', L. Ranin and M. Svabic. Biofilm formation by *Salmonella*

- spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. Letters in Applied Microbiology, 2004, 38, 428–432.
13. O. Obemeata, F. Nnenna and N. Christopher Microbiological assessment of stored *Tilapia guineensis*. African J. of Food Sci. Vol. 5(4), pp. 242 – 247, 2011.

Биолог. журн. Армении, 1 (69), 2017

ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ФУКОЗОСПЕЦИФИЧЕСКОГО ЛЕКТИНА ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ НОВООБРАЗОВАНИЙ

ГЮРДЖЯН К.Г.¹, ДАВТЯН М.П.¹, ГРИГОРЯН Р.М.², САРКИСЯН Н.К.²

¹Институт биохимии им. Г.Х. Буниятыана НАН РА, Севака 5/1

²Институт Молекулярной биологии НАН РА
gristinegurjyan1993@mail.ru

Лектины, углеводсвязывающие белки, рассматриваются в качестве перспективных маркеров для выявления опухолей. Проведена очистка фукозоспецифического лектина из луковиц тюльпана. Процедура очистки включала фракционирование сульфатом аммония, ионообменную хроматографию. При электрофорезе, проведенном в неденатурирующих условиях, получен гомогенный препарат белка. Проведена иммобилизация фукозоспецифического лектина на предварительно силанизированные поверхности предметных стекол. Показано его специфическое связывание с клеточной линией хронической миелоидной лейкемии человека KCL22.

Фукозоспецифический лектин – агглютинация – силанизация – опухоль

Լեկտինները՝ ածխաջրեր կապող սպիտակուցները, դիտվում են որպես հեռանկարային մարկերներ նորագոյացությունների ախտորոշման ժամանակ: Իրականացվել է ֆուկոզապեցիֆիկ լեկտինի անջատում վարդակակաչի սոխուկներից: Լեկտինի մաքրման ընթացքը ներառում է ամոնիումի սուլֆատով նստեցումը և իոնափոխանակային բրոմատոգրաֆիան: Ստացվել է էլեկտրոֆորետիկ հոմոգեն սպիտակուց: Էլեկտրոֆորեզն իրականացվել է ոչ դենատուրացված պայմաններում: Վերոնշյալ սպիտակուցը իմոբիլիզացվել է սիլանիզացված առարկայակիր ապակու մակերեսին: Ցույց է տրված տվյալ լեկտինի խնամակցությունը մարդու արյան բրոնխի միելոիդ լեյկեմիայի KCL22 բջջային գծի հետ:

Ֆուկոզապեցիֆիկ լեկտին – ագլուտինացում – սիլանիզացում – ուռուցք

Lectins - carbohydrate binding proteins, are considered as the prospective markers for tumor detection. In this respect, the purification of fucose specific lectin from tulip bulbs was conducted. Purification involved fractionation by ammonium sulphate, followed by ion –exchange chromatography. As a result electrophoretically homogeneous protein in non-denaturing conditions was obtained. The protein immobilization on silanized glass slides was conducted and its binding with human chronic myeloid leukemia cell line KCL22 was demonstrated.

Fucose specific lectin- agglutination- silanization- tumor

Процесс канцерогенеза сопровождается серьезными изменениями в метаболизме клетки, направленными на обеспечение ряда функций. В частности, активируется пролиферация клетки с одной стороны, с другой - предотвращается иммунный ответ. Одной из основных характеристик опухолевых клеток, отличающих их от нормальных, - это aberrantное гликозилирование. Причем гликозилирование затрагивает как внутриклеточные белки, так и белки на плазматической мембране. Первое четкое экспериментальное доказательство того, что злокачественная трансформация

приводит к изменениям в процессах гликозилирования на поверхности клетки, было представлено в работах [2, 4, 5, 6, 8, 9].

Гликозилирование определяет такие малигнанные свойства клеток как инвазивность и метастазирование, и, как полагают, с одной стороны увеличивает время жизни белков, блокируя их протеолиз, с другой - маскирует рецепторы на плазматической мембране, предотвращая процессы апоптоза. Результаты дальнейших исследований подтвердили, что неопластическая трансформация и злокачественная прогрессия часто сопровождаются также структурными изменениями в углеводной части гликоконъюгатов. Чаще всего наблюдается экспрессия эмбриональных углеводных антигенов, изменение групповых детерминант крови, неполный процессинг аспарагин-связанных олигосахаридов, увеличение сиализирования и содержания полилактозамина, а также разветвление триманнозильной основы комплексного типа N-связанных структур. Поэтому, неудивительно, что раковые маркеры очень часто оказываются фетальными белками. Таким образом анализ гликозилирования может с одной стороны позволить детектировать опухолевые клетки, с другой - служить мишенью для терапии.

Фукозилирование является одной из наиболее распространенных модификаций гликопротеинов и гликолипидов при онкотрансформации. Фукозилирование включает присоединение остатка фукозы к N-гликанам, O-гликанам и гликолипидам. L-фукоза является важным компонентом секреторных гликоконъюгатов и определяет фенотип многих клеточных популяций человека, так как L-фукоза входит в состав многих антигенных детерминант, в том числе антигенов групп крови и раковоэмбриональных антигенов, экспрессируемых при различных онкологических заболеваниях.

Хорошим инструментом для изучения процессов гликозилирования являются лектины - углеводов связывающие белки, широко распространенные во всех организмах. К настоящему времени получено и изучено более двух сотен растительных, животных и бактериальных лектинов. Они характеризуются специфичностью к различным сахарам, и следовательно, разнообразие лектинов может быть эффективно использовано для детекции процессов гликозилирования. Поскольку aberrантное гликозилирование при ряде опухолей характеризуется фукозилированием белков плазматической мембраны, в данной статье была сделана попытка получения фукозоспецифического лектина и изучения его способности связывать опухолевую клеточную линию KCL-22. Из литературы [1] известно, что лектин с такой специфичностью присутствует в луковицах тюльпана, поэтому работа была направлена на очистку и изучение этого лектина.

Материалы и методы

Спектральные измерения проводили на спектрофотометре Hitachi 150-40, концентрацию белка определяли по оптической плотности при длине волны 224 нм и 236 нм согласно [3]. Электрофорез в неденатурирующих условиях проводили по методу [7]. Для хроматографии использовали ионообменники Toyopearl 650 M (Japan) и CM-52 фирмы Реанал.

Определение агглютинирующей активности лектина. Для анализа активностей применяли трипсинизированные эритроциты человека. В агглютинационных исследованиях использовали 4% суспензию трипсинизированных эритроцитов. К 50 мкл суспензии эритроцитов добавляли равный объем раствора лектина, инкубировали от 10 мин до 2 часов при 4°C, комнатной температуре и при 37°C

Силанизация стекла. Силанизацию проводили в 5% растворе силана (3-aminopropyltriethoxysilane) в ацетоне в течение 18 часов при комнатной температуре.

Иммобилизация белка. Силанизированные предметные стекла активировали 2 %

глутаровым альдегидом в 0,1 М натрий-фосфатном буфере pH 7.4 в течение 18 часов при комнатной температуре, промывали дистиллированной водой, затем фосфатно-солевым буфером, добавляли раствор фукозоспецифичного лектина в фосфатно-солевом буфере (0,7 мг/мл), инкубировали 18 часов при 4°C. Несвязавшиеся активные участки блокировали бычьим сывороточным альбумином в конечной концентрации 0,3 %.

Клеточная культура. В работе использовали суспензионную клеточную линию KCL-22 (хроническая миелоидная лейкемия человека). Клетки выращивали при 37°C с 5% CO₂ в питательной среде RPMI-1640 с добавлением 10% раствора бычьей эмбриональной сыворотки, 2 мМ L-глутамин, 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина.

Для определения специфического связывания клеток с лектином опухолевые клетки инкубировали с лектин иммобилизованными стеклами в течение 1 ч, стекла промывали фосфатно-солевым буфером, фиксировали раствором этанол: уксусная кислота (3:1), окрашивали красителем Гимза (5%) и анализировали связывание клеток микроскопически (NumaScore 16100/1). В контрольных экспериментах для исключения возможности неспецифического связывания проводили анализ связывания клеток с силанизированными стеклами, иммобилизованными бычьим сывороточным альбумином.

Результаты и обсуждение.

Очистка лектина из луковиц тюльпана. 50 гр мелконарезанных луковиц тюльпана гомогенизировали в 250 мл фосфатно-солевого буфера (0.02 М фосфат натрия, 0.15 М хлорид натрия pH 7.4), экстрагировали 1 час. Экстракт центрифугировали 20 мин при 5000 x g надосадок фракционировали сульфатом аммония, собирая фракции между 40 и 60% насыщения. Осадок диализовали против буфера (0.02 М Трис HCl pH 8.7), осветляли центрифугированием и наносили на колонку с анионообменником Тоуорpearl-650 M, (2.5x3 см), заранее уравновешенную тем же буфером. Собирали несвязавшуюся с носителем фракцию, диализовали против 0.01 М натрий-ацетатного буфера pH 4.7 и наносили на колонку с КМ-целлюлозой (2.5x1.5 см), уравновешенную тем же буфером. Колонку промывали буфером до тех пор пока оптическое поглощение элюата не составляло менее 0.02. Далее собирали фракции ступенчатой элюцией 0.01 М ацетатным буфером, содержащим хлорид натрия в концентрации 0.05 М, 0.1 М, и 0.2 М. Хроматографическое поведение белка на колонке представлено на рис 1.

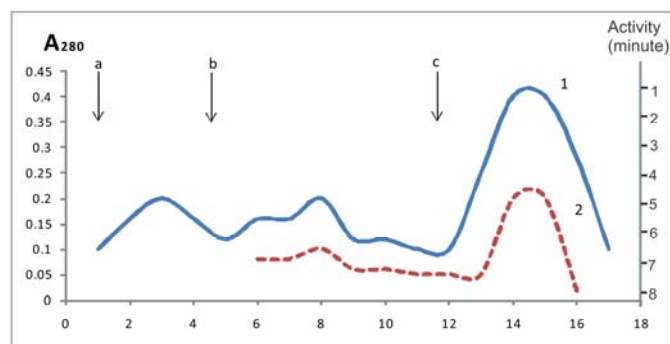


Рис. 1. Ионообменная хроматография фукозоспецифического лектина на КМ-целлюлозе. 1-хроматограмма, 2-активность. Фракции собирали по 2 мл. а- концентрация NaCl - 0.05 М, б - 0.1 М, в - 0.2 М.

В результате проведенных процедур получен электрофоретически гомогенный препарат лектина из луковиц тюльпана, проявляющий агглютинационную активность по отношению к трипсинизированным эритроцитам человека I(O) группы крови (рис 2).

Результаты исследования связывания опухолевых клеток с фукозоспецифическим лектином представлены на рис. 2. Было выявлено специфическое связывание опухолевых клеток хронической миелоидной лейкемии человека только с лектин иммобилизованными стеклами (рис 2а). Связывание клеток с силанизированными стеклами, используемыми в качестве контроля для исключения возможности неспецифического связывания, не наблюдалось (рис 2б). Таким образом, можно заключить что фукозоспецифический лектин проявляет сродство к опухолевым клеткам данного вида.

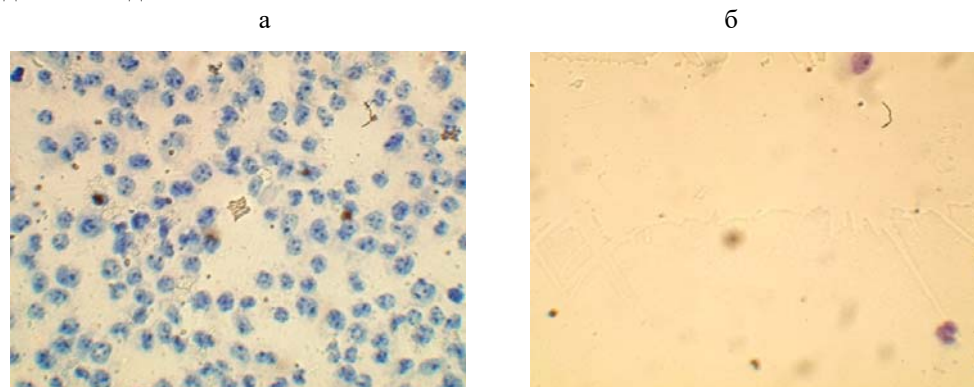


Рис. 2. а - связывание клеток с силанизированными стеклами, б - контроль, окрашивание по Романовскому-Гимзе, увеличение 400 х.

Схематическое изображение процесса прикрепления клеток к поверхности силанизированных стекол представлено на рисунке 4.

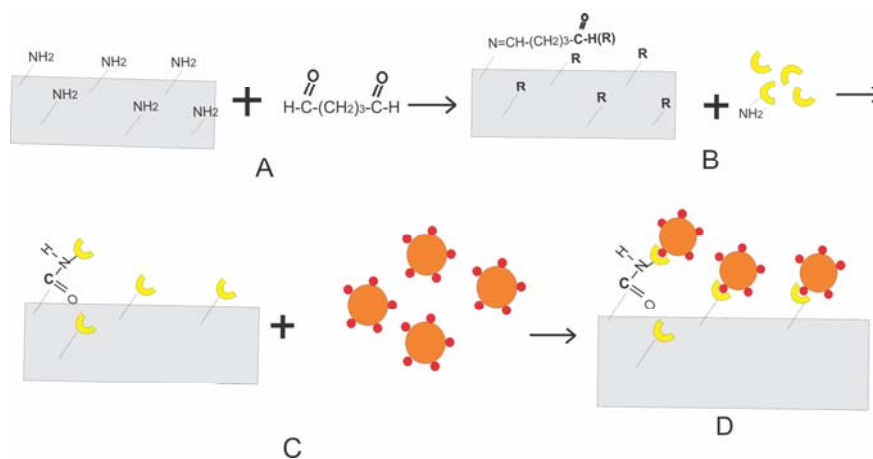


Рис.3. А - активация силанизированных стекол глютаровым альдегидом, В - иммобилизация фукозоспецифического лектина на поверхности предметных стекол, С, D - прикрепление опухолевых клеток.

Таким образом, результаты проведенных экспериментов демонстрируют, что фукозоспецифический лектин может быть успешно применен для детекции и идентификации некоторых опухолевых клеток, и, в перспективе, для выделения собственно опухолевых клеток из биопсийного материала с целью последующего использования при получении противораковых препаратов.

Литература

1. Cammue B. P. A., Peeters B., Peumans W. J.. A new lectin from tulip (*Tulipa*) bulbs.// *Planta*, 1986, 169, 583
2. Dennis JW, Granovsky M, Warren CE. Glycoprotein glycosylation and cancer progression. // *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1473 (1), 21–34
3. Groves W, Davis F, Sells BH. Spectrophotometric determination of microgram quantities of protein without nucleic acid interference. // *Anal. Biochem*, 1968, 22, (2) 195-210
4. Guo JM, Zhang XY, Chen HL, et al. Structural alterations of sugar chains in urine fibronectin from bladder cancer patients and its enzymatic mechanism.// *J Cancer Res Clin Oncol*, 2001, 127 (8), 512–9
5. Hakomori S. Introductory remarks on aberrant glycosylation in tumors. In: *Altered Glycosylation in Tumor Cells*, Cold Spring Harbor: AR Liss, Inc 1988 : 2017- 12
6. Nabi IR, Dennis JW. The extent of polylactosamine glycosylation of MDCK LAMP-2 is determined by its Golgi residence time. // *Glycobiology*, 1998, 8 (9), 947–53
7. Takano R, Muchmore E, Dennis JW. Sialylation and malignant potential in tumour cell glycosylation mutants. // *Glycobiology*, 1994, 4 (5), 665–74
8. Unverzagt C, Andre S, Seifert J, et al. Structure-activity profiles of complex biantennary glycans with core fucosylation and with/without additional alpha 2,3/alpha2,6 sialylation: synthesis of neoglycoproteins and their properties in lectin assays, cell binding, and organ uptake. // *J Med Chem*, 2002, 45 (2), 478–91

Биолог. журн. Армении, 1 (69), 2017

АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ БИОСИНТЕЗА ПРОЛИНА И ИХ ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ В РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНАХ РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ *PARASALMO MIKISS*

А. А. ЗАХАРЯН

*Ереванский государственный университет, кафедра биохимии, микробиологии и биотехнологии
ani.zakharyan@ysu.am*

Была исследована активность ферментов биосинтеза пролина из орнитина (орнитин-трансаминазы и пирролин-5-карбоксилатредуктазы) и внутриклеточная локализация этих ферментов в различных органах радужной форели. Исследования показали, что самая высокая активность этих ферментов обнаружено в икринках и в печени, а самая низкая - в почках. Активность ферментов биосинтеза пролина из орнитина проявляется как в надосадочной, так и в осадочной фракции гомогената, но более высокая активность проявляется в осадочной фракции, то есть эти ферменты имеют митохондриальную локализацию.

Орнитин-трансаминаза - пирролин-5-карбоксилатредуктаза - внутриклеточная локализация ферментов

Ուսումնասիրվել է օրնիտինից պրոլինի կենսասինթեզի ֆերմենտների (օրնիտին-տրանսամինազի և պիրոլին-5-կարբօքսիլատռեդուկտազի) ակտիվությունը և այդ ֆերմենտների ներքային տեղակայումը իշխան ձկան տարբեր օրգաններում: Հետազոտությունները ցույց են տվել, որ այդ ֆերմենտների ամենաբարձր ակտիվություն հայտնաբերվել է ձկնկիթներում և լյարդում, իսկ ամենա-

ցածր ակտիվություն՝ երկամետրում: Օրնիտինից պրոլինի կենսասինթեզի ֆերմենտների ակտիվություն հայտնաբերվել է հոմոգենատի և վերստվածքային, և նստվածքային ֆրակցիաներում, բայց ավելի բարձր ակտիվություն դրսևորվել է նստվածքում, այսինքն՝ այս ֆերմենտներն ունեն միտոքոնդրիալ տեղակայում:

օրնիտինտրանսամինազ - պիրոլին-5 - Կարբօքսիլատռեդուկտազ-ֆերմենտների ներքջային տեղակայում

The regulation of the activity of the enzymes (ornitintransaminase and pyrroline-5-carboxylate reductase) during the proline synthesis from the ornitine in the different organs of the trout has been studied. It is discovered that the activity of the enzymes is much higher in the Caviar and in the liver, and much deep in the kidneys. The activity of the enzymes during the proline synthesis from the ornitine are found in the supersedimentary and sedimentary fraction of the homogenate, but more higher in the sedimentary fractinon, that is these enzymes have mitoqondriallocalization.

Ornitintransaminaze - Pyrroline-5-carboxylate reductaze – Ultracellular localization of enzymes

Биосинтез пролина у микроорганизмов, растений и животных осуществляется двумя известными путями: глутаматным и орнитиновым. В результате начальных реакций обоих путей образуются L-полуальдегидглутаминовой кислоты и продукт его спонтанной циклизации: L-пирролин-5-карбоксилат (П5К). Биосинтез пролина из орнитина происходит либо дезаминированием аминогруппы орнитина в альфа-положении с образованием пирролин-2-карбокилата (П2К), либо в дельта положении с образованием П5К, который имеет свойства, связанные с редокс балансом и осмотическим стрессом и дает возможность фокусироваться на различные исследования в областиздравохранения и агрономии [2]. Биосинтез пролина из орнитина осуществляется с помощью двух ферментов: орнитинтрансаминазы (ОТ) и пирроллин-5-карбоксилатредуктазы (П5КР).

Для изучения различных ферментов чрезвычайно важным является вопрос о локализации ферментов в структурных образованиях клетки (ядро, митохондрии, лизосомы и др.). Основное место синтеза белка фракция рибосом. Показано, что ферменты гликолиза сосредоточены преимущественно в растворимой фракции цитоплазмы, в то время как цитохромоксидаза и ферменты цикла Кребса локализованы во фракции митохондрий. С митохондриями связаны также ферменты, катализирующие окислительное фосфорилирование и распад жирных кислот. Ферменты, катализирующие биосинтез жирных кислот, наоборот, содержатся в растворимой фракции цитоплазмы. Разнообразные гидролазы илиазы сосредоточены преимущественно в лизосомах. Нуклеотидилтрансферазы, ускоряющие реакцию переноса нуклеотидных остатков при новообразовании нуклеиновых кислот, локализованы в основном в ядерном аппарате кетки. Согласно данным литературы ферменты биосинтеза пролина из орнитина (ОТ и П5КР) сосредоточены в растворимой фракции гомогенатов, хотя активность ферментов обнаруживается и в митохондриальной фракции [4]. Нами была поставлена задача изучить активность ферментов биосинтеза пролина из орнитина: ОТ и П5КР и выявить их внутриклеточную локализацию в различных органах радужной форели.

Материал и методика

Объектом исследования служили самки рыбы форель (ParasamoMikiss) массой 0.7-1 кг. Исследования проводии в летние месяцы. Активность ферментов биосинтеза пролина определяли по количеству синтезированного пролина. Количество пролина определяли химическим методом Блументрантца [3]. Статистическую достоверность полученных данных рассчитывали по методу вариационной статистики с выделением критерия достоверности по Стюденту (p).

Результаты и обсуждение

В первую очередь мы изучили активность ферментов биосинтеза пролина из орнитина: ОТ и П5КР в различных органах радужной форели (табл.1)

Таблица 1. Активность ферментов биосинтеза пролина в различных органах радужной форели, 1 мкМоль/г свежей ткани, n=5, M ± m

Органы	Активность ОТ и П5КР
Почки	1.01 ±0.07
Печень	5.21 ±0.37
Жабры	1.69 ±0.17
Сердце	2.78 ±0.20
Икринки	6.4 ±0.44

Было показано, что активность ферментов биосинтеза пролина из орнитина наиболее высока в икринках и в печени, и наиболее низка - в почках. Ранее в нашей лаборатории была изучена активность ферментов биосинтеза пролина в различных органах сазана и если сравнить активность ферментов биосинтеза пролина радужной форели и сазана, то можно отметить, что у форели во всех органах, кроме почек, активность ферментов выше, чем у сазана, в почках же, наоборот, выше у сазана [1]. Далее нами была исследована внутриклеточная локализация ферментов биосинтеза пролина в некоторых органах форели (табл.2).

Таблица 2. Внутриклеточная локализация ферментов биосинтеза пролина в различных органах радужной форели, 1 мкМоль/г свежей ткани, n=5, M ± m

Органы	фракции	Активность ОТ и П5КР
Почки	гомогенат	1.12 ±0.08
	надосадок	0.28 ±0.03
	осадок	0.73 ±0.05
Печень	гомогенат	5.32 ±0.38
	надосадок	2.17 ±0.15
	осадок	3.07 ±0.21
Сердце	гомогенат	2.29 ±0.17
	надосадок	1.69 ±0.10
	осадок	1.51 ±0.09

Результаты исследования показали, что активность ферментативного процесса биосинтеза пролина из орнитина проявляется как в надосадке, так и в осадке, причем в печени активность в осадке значительно выше, а в сердце почти одинакова в осадке и в надосадке. Полученные данные дают возможность сделать вывод о том, что в различных органах форели ферменты биосинтеза пролина имеют в основном митохондриальную локализацию, следовательно обнаруженную нами некоторую активность в надосадке можно объяснить переходом при гомогенизации органов фермен-

тов из митохондрий в растворимую фракцию, тем более, что гомогенизация и центрифугирование проводились в гипоосмотической среде.

Литература

1. Минасян З. С. Аргиназа, ферменты биосинтеза и катаболизма пролина в различных органах сазана CYRPINUSCARPIO, канд. диссертация, 2001
2. Arellano. I. P., Alvarez F. C., Martinez A. I., Rodriguez-Diaz J., Cervera J., Pyrroline-5-carboxylate synthase and proline biosynthesis: From osmotolerance to rare metabolic disease, Protein Sci, 19(3), p. 372-382, 2010
3. Blumenkrantz N., Biochemical methods of aminoacides determination, Clin. Biochem, 13, p. 177, 1980
4. Singo et al. Mitochondrial localization of enzymes of proline synthesis in the different organisms, Biochim. Biophys, 2, p. 18-22, 1981

Биолог. журн. Армении, 1 (69), 2017

РЕГУЛИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ SKQ1 НА АКТИВНОСТЬ Mg^{2+} -АТФАЗЫ В МИТОХОНДРИЯХ РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНОВ КРЫС ПРИ КОРАЗОЛ-ИНДУЦИРОВАННЫХ ЭПИЛЕПТИФОРМНЫХ ПРИПАДКАХ

А.С. МАРГАРЯН¹, Р.Б. БАДАЛЯН¹, А.А. СИМОНЯН², Р.А. СИМОНЯН¹

¹Институт биохимии им. Г.Бунятына НАН РА

²Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, РФ
anahit78.78@mail.ru

Ցույց է տրվել, որ սպիտակ առնետների ներարկված SkQ1-ը համահարթեցնում է ուղեղից և լյարդից անջատված միտոքոնդրիումներում Mg^{2+} -ԱՏՖազի ակտիվության դրսևորած շեղումները կորագրվի տարբեր չափաբաժիններով մակածված էպիլեպսիայի դեպքում:
Էպիլեպսիա, կորազոլ, միտոքոնդրիում, SkQ1, Mg^{2+} -ԱՏՖազ:

Было показано, что при моделированных эпилептиформных припадках разными дозами коразола инъекция SkQ1 корректирует отклонения в активности Mg^{2+} -АТФазы в митохондриях мозга и печени белых крыс.

Эпилепсия, коразол, митохондрии, SkQ1, Mg^{2+} -АТФаза.

It has been shown that injected SkQ1 correlated Mg^{2+} -ATPase activity changes from white rats brain and liver mitochondria during epilepsy induced by using different doses of corazole.

Epilepsy, corazole, mitochondria, SkQ1, Mg^{2+} -ATPase.

Эпилепсия является хроническим полиэтиологическим заболеванием, распространенность которого среди населения земного шара составляет около 5 случаев на 1000 человек (т.е. 0,5%), а в слабо развитых странах достигает 0,8-1% и более. Сложность и многогранность эпилепсии, а также его влияние на все стороны жизни больного человека диктует необходимость глубокого анализа этой проблемы с медико-социальной точки зрения [2].

Фосфорные соединения входят в состав цитоплазмы и клеточных структур организма и являются обязательным условием их существования и нормальной жизнедеятельности клеток. Углеводы и их производные служат энергетическим,

структурным и пластическим материалом, субстратами и регуляторами важнейших биохимических процессов. Есть основание полагать, что содержанием и интенсивностью распада фосфорных соединений определяется функциональное состояние центральной нервной системы (ЦНС). Дефицит ферментов энергетического обмена может привести к тяжёлым заболеваниям [3], в том числе, эпилепсии.

В наших предыдущих работах [4-6] было показано, что при эпилептиформных припадках, индуцированных коразолом, статистически достоверно стимулируется функциональная активность АТФазы в различных органах у белых крыс, а эндогенно введенный α -токоферол и его синергист – тиосульфат натрия выступают в роли антиоксидантного стимулятора эндогенной системы антирадикальной защиты клетки.

Целью настоящего исследования явилось выяснение роли известного препарата Скулачёва – SkQ1 в изменении активности АТФазы. SkQ, разработанный акад. В.П.Скулачевым и сотр. в Институте физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского МГУ, является производными пластохинона, конъюгированными с липофильными катионами, что позволяет им свободно проникать через бислоиные липидные мембраны митохондрий [8].

В представленной работе в опытах *in vivo* мы исследовали влияние SkQ1 на каталитическую активность Mg^{2+} -АТФазы в митохондриях белых крыс при коразол-индуцированных эпилептиформных припадках. Эпилептиформные припадки вызывали одноразовым введением разных доз коразола (5 мг или 8 мг), что позволило изучить также дозовую зависимость изменений активности исследуемого фермента.

Материалы и методы

В экспериментах использовали беспородных крыс-самцов массой 180-200 г, содержащихся в условиях вивария при естественном освещении и свободном доступе к воде и пище. Эпилептиформные припадки вызывали одноразовым введением коразола внутримышечно из расчета 5 мг или 8 мг на 100 г веса животного.

Подопытные животные были разделены на 5 групп. Животным контрольной группы вводили 1мл физраствора. В опытных группах II и III животным вводили коразол из расчета 5 мг или 8 мг на 100 г веса животного в 1 мл воды. Животные опытных группа IV и V в течение 2 дней вводили SkQ1 в расчете 37 нм SkQ1 в 1мл воды один раз в день, а в день опыта вводили коразол 5 мг или 8 мг на 100 г веса животного в 1мл воды.

Судорожное поведение наблюдали в течение 20 мин после инъекции коразола. Стадии судорог определяли по модифицированной шкале Racine R.J. [11].

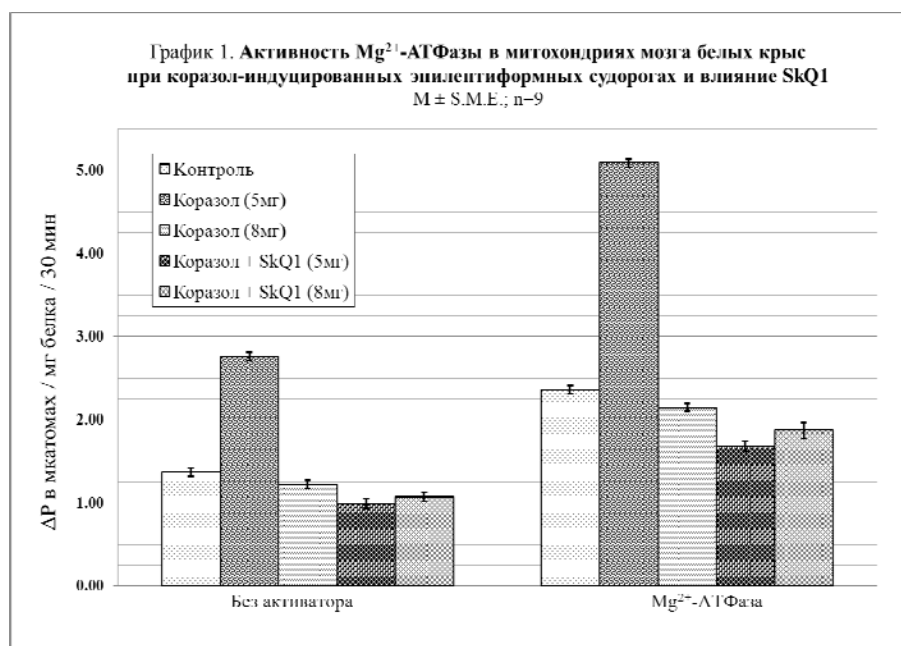
Животных декапитировали после полного проявления генерализованных тонико-клонических судорог. После декапитации соответствующих тканях определяли активность Mg^{2+} -АТФазы по нарастанию в среде содержания неорганического фосфата. $P_{неорг.}$ определяли по Лоури и соавт. [9] в модификации Скулачева [7] и пересчитывали на мг белка [10]. Полученные данные обработаны статистически. Достоверность различий между средними величинами определяли по t-критерию Стьюдента [1].

Результаты и обсуждение

Данные, полученные в результате наших исследований, показывают, что при разных дозах коразола сдвиги в активности Mg^{2+} -АТФазы неодонозначны.

Данные наших экспериментов по изучению сдвигов активности Mg^{2+} -зависимой АТФазы в интактных митохондриях мозга крыс при коразол-индуцированных эпилептиформных судорогах под воздействием SkQ1 приведены в графике 1.

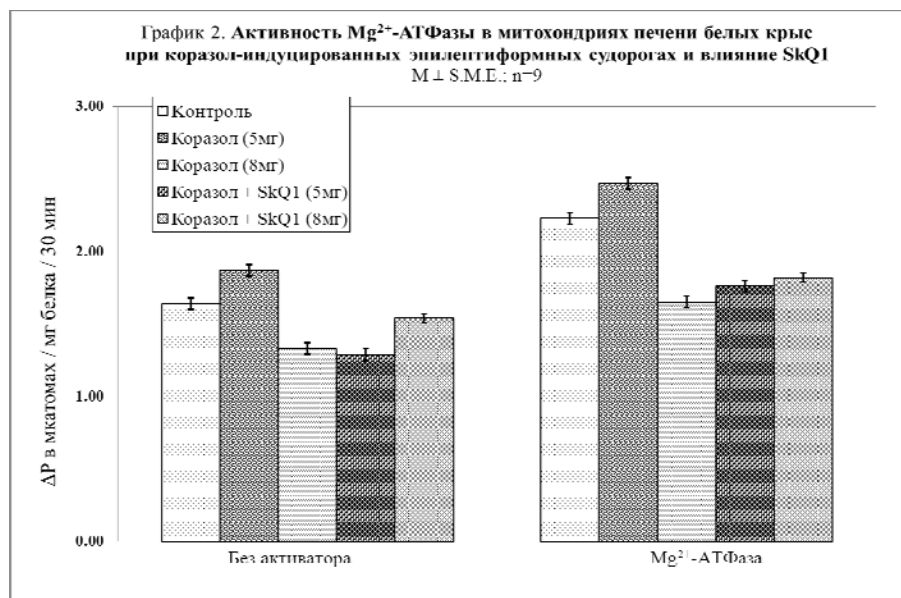
Как показывают полученные результаты, при внутримышечном введении крысам коразола в дозе 5 мг на 100 г веса животного в митохондриях мозга приводит к повышению АТФазной активности. При инъекции коразола в дозе 8мг/100г каталитическая активность фермента, по сравнению с контролем, угнетается. Под влиянием SkQ1 активность Mg^{2+} -АТФазы в опытной группе IV достоверно ингибируется по сравнению с данными, полученными от II группы, а в группе V введение SkQ1 приводит к достоверному повышению активности АТФазы по сравнению с группой III. Из полученных данных можно констатировать тот факт, что SkQ1 имеет протекторное влияние на патогенные сдвиги в активности АТФазы при воздействии коразола.



Интересные результаты получены также при изучении активности фермента в печеночной ткани. В тех же условиях опыта при внутримышечном введении коразола в дозе 5мг/100г веса каталитическая активность Mg^{2+} -зависимой АТФазы в митохондриях печени также достоверно стимулируется по сравнению с контролем (график 2). Введение же коразола в дозе 8мг/100 г не стимулирует активность Mg^{2+} -АТФазы в митохондриях печени, а наоборот - ингибирует.

При изучении активности фермента в печеночной ткани при совместном введении SkQ1 и коразола согласно данным, приведенным в графике 2, активность фермента в митохондриях печени под влиянием введенного крысам SkQ1 подавляется по сравнению с группой животных, получивших только коразол в дозе 5мг/100г. При совместной же инъекции коразола в количестве 8 мг и SkQ1 наблюдается стимулирование активности Mg^{2+} -АТФазы в митохондриях печени по сравнению с группой животных, получающих только коразол в дозе 8мг/100г веса животного.

Обобщая данные наших опытов, можно заключить, что внутримышечное введение SkQ1 нивелирует отклонения в активности Mg^{2+} -АТФазы в изолированных митохондриях мозга и печени белых крыс при моделированных эпилептиформных припадках разными дозами коразола.



Список используемой литературы

1. Бессмертный Б.С. Математическая статистика в клинической, профилактической и экспериментальной медицине. М. 1967.
2. Дзяк Л.А., Зенков Л.Р., Кириченко А.Г. Эпилепсия. – Киев: Книга-плюс, С.168. 2001.
3. Рудакова И.Г. Влияние современных противоэпилептических препаратов на качество жизни больных эпилепсией / И.Г. Рудакова, О.С. Морозова, А.С. Котов // Журн. неврол. и психиатрии им. С.С. Корсакова. - 2008. Вып. 3. - С. 36-40.
4. Симонян Л.А., Симонян А.А., Бадалян Р.Б., Маргарян А.С., Симонян Р.А., Карагезян К.Г. Корректирующий эффект α -токоферола и тиосульфата натрия на активность АТФ-фосфогидролазы в митохондриях печени крыс с моделированным коразолом эпилептиформным припадком. // Международная академия наук экологии и безопасности жизнедеятельности. Вестник. Санкт-Петербург. 2005. Т. 10. N 5. С. 174-176.
5. Симонян Л.А., Симонян А.А., Карагезян К.Г. АТФ-фосфогидролазная активность в мозге крыс при эпилептиформных припадках, индуцированных коразолом. // Биол.ж. Армении. 2004. Т. 56. N 3-4. С. 226-231.
6. Симонян Л.А., Симонян Г.М., Симонян А.А., Симонян М.А. Повреждающее воздействие эпилептогена коразола на металлопротеины крови *in vivo*. // Мед. наука Арении. 2005. Т. XIV, N 1. С. 30-33.
7. Скулачев В.П. Энергетика биологических мембран. М.: Наука. 1989. – 564 стр.
8. Illingworth B., Cori G.T. // Biochemistry Preparations. 1953. V. 3. P. 1-9.
9. Lowry O.H., Lopez J.A. Determination of inorganic phosphate in the presence of labelling ester. // J. Biol. Chem. 1946. V. 162. P. 421.
10. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the folin-phenol reagent. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265-275.
11. Racine R.J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II Motor seizures. // Electroencephal. Clin. Neurophysiol. 1972. V. 32. P. 281–294.

ВЛИЯНИЕ sFASL НА УРОВНИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В КЛЕТКАХ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ ВТОРОГО ТИПА

МАРГАРЯН С.,^{1,2} МАРТИРТОСЯН А.,^{1,2} КАРАБОН Л.,³
ВИТКОВИЧ А.,³ МАНУКЯН Г.^{1,2}

¹Институт молекулярной биологии НАН РА

²Российско-Армянский (Славянский) университет, Ереван, Армения

³Институт иммунологии и экспериментальной терапии им. Л. Хирифельда, Вроцлав, Польша

Сахарный диабет второго типа (СД2т) является метаболическим заболеванием, характеризующимся хронической гипергликемией, недостаточностью секреции или действия эндогенного инсулина, а также дисфункцией бета клеток поджелудочной железы. Результаты последних исследований показывают, что в основе развития многих осложнений при СД2т лежит нарушенная регуляция окислительного стресса. Целью данной работы явилось определение влияния растворимого лиганда Fas (solubleFasL) на окислительные процессы в клетках врожденного иммунитета у больных СД2т и здоровых доноров. В частности, определялись уровни активных форм кислорода (АФК) и экспрессии некоторых генов окислительного стресса (*NCF-1*, *Catalase*). Согласно полученным данным, sFasL значительно повышает уровни АФК в клетках цельной крови больных СД2т. Также было показано, что в нейтрофилах больных после воздействия sFasL уровни экспрессии каталазы снижаются по сравнению с контрольной группой. Кроме того, неиндуцированный и sFasL-индуцированный уровень экспрессии гена NADPH оксидазы оказался ниже в нейтрофилах больных, чем в здоровых клетках. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что sFasL способствует повышению уровней окислительного стресса у больных СД2т. Однако, пониженные уровни экспрессии NADPH оксидазы как в неиндуцированных так и sFasL-индуцированных нейтрофилах больных СД2т указывают на то, что NADPH оксидаза, вероятнее всего, не вовлечена в процесс sFasL-индуцированного повышения уровней окислительного стресса.

окислительный стресс, sFasL, NADPH оксидаза, каталаза, АФК

Сахарный диабет 2-ого типа (СД2т) является метаболическим расстройством, характеризующимся гипергликемией и недостаточностью секреции или действия эндогенного инсулина, а также дисфункцией бета клеток поджелудочной железы. Причиной развития СД2т могут являться комплекс факторов, в том числе генетическая предрасположенность и факторы окружающей среды. СД2т зачастую связан с острыми макро- и микро-васкулярными осложнениями, которые приводят к повреждению тканей внутренних органов примерно у половины людей с диабетом [1]. Механизмы, лежащие в основе развития осложнений при СД2т, полностью не изучены. Одной из основных причин развития осложнений при СД2т считается нарушение регуляции окислительного стресса, что проявляется в повышении продукции свободных радикалов, а также нарушениях в системе антиоксидантной защиты организма [2]. Известно, что заболевание связано с активацией некоторых транскрипционных факторов и протеинкиназы C, а также образованием конечных продуктов гликозирования (КПГ). В плазме крови конечные продукты гликозирования связываются с рецепторами КПГ, находящимися на поверхности макрофагов, эндотелиальных и мышечных клетках сосудов. Этот процесс приводит к образованию активных форм кислорода, что в свою очередь активирует экспрессию воспалительных генов [3].

Недавно было показано, что генерация АФК приводит к активации рецептора Fas [4]. Кроме того, у больных СД2т повышенные уровни глюкозы увеличивают уровни экспрессии рецептора Fas и его лиганда FasL [5]. Однако, влияние лиганда sFasL (soluble FasL) на уровни окислительного стресса при СД2т не было изучено. Целью данной работы явилось определение влияния sFasL на окислительные процессы в нейтрофилах у больных СД2т и здоровых контролей. Для этой цели были изучены уровни АФК в клетках цельной крови после стимуляции sFasL, а также уровни мРНК генов NADPH оксидазы (NCF-1) и каталазы (CAT).

Материалы и методы

Образцы периферической крови были получены от 17 больных СД2т (средний возраст 54.5 ± 4.8) и 13 здоровых контролей (средний возраст 35 ± 5.2). Диагноз СД2т был поставлен согласно международным критериям (ВОЗ, 2003). Исследование было одобрено этическим комитетом института молекулярной биологии НАН РА (IRBIORG0003427).

Invitro модель индуцирования клеток sFasL: Образцы цельной крови были культивированы в среде RPMI-1640 (Gibco) с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки и 2 mM-глутамина. Для исследования экспрессии генов в нейтрофилах, клетки были выделены на градиенте Histopaque®-1077, после чего 6×10^6 клеток были культивированы в той же среде в течение 3 часов при 37°C . Для изучения *invitro* воздействия sFasL лиганда (150 ng/ml) клетки были культивированы в присутствии или отсутствии лиганда. После культивации образцы цельной крови были использованы для измерения уровней окислительного стресса, а нейтрофилы были сохранены при -20°C в RNeasy до проведения ПЦР в реальном времени.

Измерение уровней АФК: Уровни окислительного стресса измерялись с помощью дигидрорадамина 123 (DHR-123). После культивации клетки цельной крови были инкубированы в присутствии $10 \mu\text{M}$ DHR-123 при 37°C . После инкубации клетки были лизированы и анализированы на проточном цитометре (Partec CyFlowSpace).

Выделение РНК и проведение ПЦР в реальном времени: Для выделения РНК был использован RNeasy® MiniKit (QIAGEN) согласно протоколу производителя. Синтез к ДНК был осуществлен с помощью набор aiScript™ Advanced cDNA Synthesis Kit (BIORAD). ПЦР в реальном времени был проведен с помощью техники TaqMan® Gene Expression Assays. ПЦР в реальном времени был запущен на приборе Applied Biosystem Viia 7 Real-Time. В качестве внутреннего контроля был использован $\beta 2$ микроглобулин ($\beta 2M$).

Статистический анализ: Статистический анализ был выполнен с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, USA). Нормальное распределение было проверено с помощью теста нормальности D'Agostino и Pearson. Группы сравнивались между собой при помощи *Paired* и *Unpaired t* теста. Статистически достоверным принималось различие между группами при значении $P \leq 0.05$.

Результаты

Согласно полученным данным спонтанная экспрессия изучаемых генов и продукция АФК в образцах цельной крови не была изменена в обеих исследуемых группах (Рисунок 2). Уровни окислительного стресса после воздействия sFasL в здоровых и больных клетках были повышены, однако только в клетках больных СД2т разница оказалась статистически достоверной ($p=0.05$) (Рисунок 1). В нейтрофилах больных СД2т после воздействия sFasL уровни экспрессии каталазы снижались по сравнению с контрольной группой ($p<0.05$). Уровни экспрессии гена NADPH оксидазы в неиндуцированных ($p<0.05$) и sFasL-индуцированных ($p<0.01$) нейтро-

филах больных СД2т были понижены по сравнению с таковыми показателями здоровых клеток (Рисунок 2).

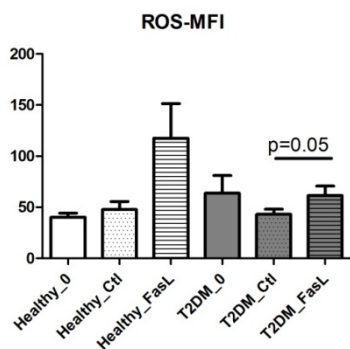


Рисунок 1: Уровень АФК в клетках оценивался по значению средней интенсивности флуоресценции родамина (MFI). Представлены базальные (0), неиндуцированные (Ctl) и sFasL-индуцированные (FasL) уровни АФК в клетках цельной крови здоровых доноров и больных СД2т.

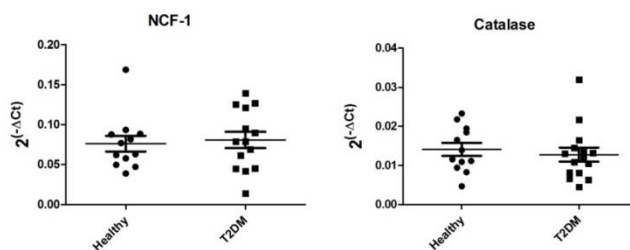


Рисунок 2: Уровни спонтанной экспрессии мРНК генов NADPH оксидазы (NCF-1) и каталазы (Catalase) в нейтрофилах больных СД2т (T2DM) и здоровых доноров (Healthy). Уровни экспрессии исследуемых генов по отношению к эндогенному контролю ($\beta 2M$) представлены в значении $2^{(-\Delta\Delta CT)}$.

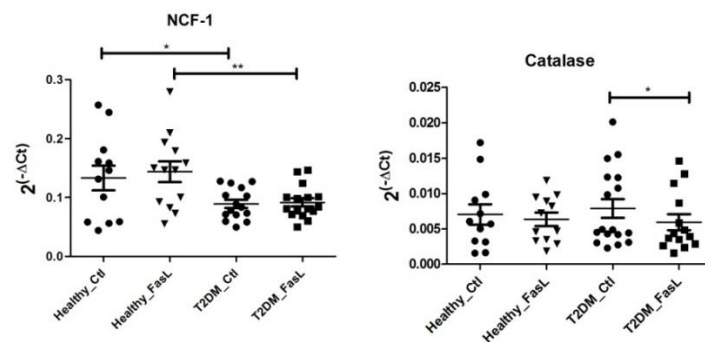


Рисунок 3: Уровни мРНК генов NADPH оксидазы (NCF-1) и каталазы (Catalase) в неиндуцированных (Ctl) и sFasL-индуцированных (FasL) нейтрофилах больных СД2т (T2DM) и здоровых доноров (Healthy). * $P < 0.05$ и ** $P < 0.01$ достоверность отличий между группами.

Обсуждение

Окислительный стресс играет ключевую роль в повреждении клеток организма при СД2т. Высокие уровни глюкозы приводят к образованию свободных радикалов в эндотелиальных клетках, нейтрофилах и макрофагах, что в конечном счете приводит к повышению уровней окислительного стресса в организме [6]. Полученные нами данные впервые показывают, что sFasL повышает уровни АФК в клетках цельной крови больных СД2т. Подтверждением этого явились сниженные уровни экспрессии

каталазы после воздействия sFasL. Каталаза является одним из основных ферментов антиоксидантной защиты организма, которая инактивирует образовавшиеся продукты окислительного стресса [7]. Недавно было показано, что недостаток каталазы вызывает увеличение продукции АФК в бета клетках поджелудочной железы, что в конечном итоге приводит к разрушению этих клеток [8].

В нейтрофилах NADPH оксидаза играет основную роль в процессе образования АФК [9]. Однако, несмотря на то, что уровни экспрессии оксидазы у больных были существенно ниже, чем у здоровых доноров (как в неиндуцированных, так и sFasL-индуцированных клетках), уровни экспрессии NADPH оксидазы (NCF-1) в нейтрофилах больных после воздействия sFasL остались неизменными.

Полученные результаты указывают на то, что усиление sFasL-индуцированных окислительных процессов в нейтрофилах больных СД2т возникает NADPH-независимым путем. Необходимы дальнейшие исследования с целью выявления альтернативных сигнальных путей, вовлеченных в процессы усиленного окислительного стресса при СД2т.

Благодарность. Работа была выполнена при поддержке Российско-Армянского университета в рамках гранта Министерства образования и науки РФ, и Государственного комитета по науке МОН РА в рамках проекта №16А-1f44.

Литература

1. *Cade WT.* Diabetes-related microvascular and macrovascular diseases in the physical therapy setting. *PhysTher*2008;88:1322-35.
2. *Ceriello A.* Oxidative stress and glycemic regulation. *Metabolism* 2000;49(2, Suppl 1):27–29.
3. *Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA.* Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*. 2006 Aug 8;114(6):597-605.
4. *Medan D, Wang L, Toledo D, Lu B, Stehlik C, Jiang BH, Shi X, Rojanasakul Y.* Regulation of Fas (CD95)-induced apoptotic and necrotic cell death by reactive oxygen species in macrophages. *J Cell Physiol* 2005;203(1):78-84.
5. *Maedler K, Spinas GA, Lehmann R, Sergeev P, Weber M, Fontana A et al.* Glucose induces beta-cell apoptosis via upregulation of the Fas receptor in human islets. *Diabetes*. 2001; 50(8): 1683–1690.
6. *Negre-Salvayre A, Salvayre R, Augé N, Pamplona R, Portero-Otín M.* Hyperglycemia and glycation in diabetic complications. *Antioxid Redox Signal*. 2009 Dec;11(12):3071-109.
7. *Shu YZ.* Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. *J Nat Prod*. 1998 Aug;61(8):1053-71.
8. *L. Góth and J. W. Eaton.* Hereditary catalase deficiencies and increased risk of diabetes. *Lancet*. 2000 Nov 25;356(9244):1820-1.
9. *Bedard K and Krause KH.* The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2007 Jan;87(1):245-313.

МИКОБИОТА КУЛЬТУРЫ КРАСНОГО ПЕРЦА НА РАЗНЫХ СТАДИЯ ВЕГЕТАЦИИ И ОБРАБОТКИ

ОВСЕПЯН ВАРДУИ ВАРДГЕСОВНА,

Ванадзорский государственный университет, Биологический факультет,
varduhi@inbox.ru

ГРИГОРЯН КАРИНЕ МАРТЫНОВНА

Ереванский государственный университет, Биологический факультет,
foodlab@inbox.ru

Микологический анализ красного перца в фермерских хозяйствах Арташатского и Армавирского районов, на разных стадиях переработки, показал на основные источники контаминации перца мицелиальными грибами. В 82% исследованных образцов плодов красного перца из Арташатского района был обнаружен вид *A. flavus*. Из 17 проанализированных образцов красного перца в 9 образцах содержание афлатоксина В₁ превышало предельно допустимые концентрации и варьировало в пределах от 10 до 50 мкг/кг. На основании полученных данных составлен план HACCP для предприятия по производству красного молотого перца. Показано, что гигиеническое состояние мельниц является одной из основных критических точек, которые способствуют дополнительному загрязнению молотого перца афлатоксигенными грибами

красный перец, Aspergillus, A. flavus, контаминация, афлатоксин, HACCP

Արտաշատի և Արմավիրի մարզերի տնտեսություններում, կարմիր պղպեղի վերամշակման տարբեր փուլերի սկզբնական վերլուծությունը ցույց է տվել միջեղի սնկերով պղպեղի աղ-տոտման հիմնական աղբյուրները: Արտաշատի մարզի կարմիր պղպեղի ուսումնասիրված նմուշների 82% հայտնաբերվել է *A. flavus* տեսակը: Կարմիր պղպեղի ուսումնասիրված 17 նմուշներից 9 նմուշում աֆլատոքսին В₁ պարունակությունը գերազանցել է թույլատրելի կոնցենտրացիան և տատանվել է 10-50 մկգ/կգ սահմաններում: Ստացված տվյալների հիման վրա, կարմիր պղպեղի արտադրության համար, կազմվել է HACCP պլանը: Ցույց է տրված, որ աղացների հիգիենիկ վիճակը այն կարևորագույն կետերից մեկն է, որոնք նպաստում են աղացած կարմիր պղպեղի լրացուցիչ աղտոտմանը աֆլատոքսիգեն սնկերով:

կարմիր պղպեղ, Aspergillus, A. flavus, աղտոտվածություն, աֆլատոքսին, HACCP

In the farms of the Artashat and Armavir districts, the mycologic analysis of red pepper, at different stages of processing, has shown the main sources of pepper contamination by filamentous fungi. The species *A. flavus* was found in the 82% of the studied samples of red pepper roots from the Artashat district. The maintenance of the aflatoxin B₁ exceeded the maximum permissible concentration in 9 samples out of 17 analysed samples of red pepper and varied from 10 up to 50 mkg/kg. On the basis of the obtained data, the plan of HACCP was made for the enterprise producing red ground pepper. It shows that, the hygienic state of mills is one of the main critical points which contributes to the additional contamination of the ground pepper by aflatoxigenic fungi.

Key words: red pepper, *Aspergillus*, *A. flavus*, contamination, aflatoxin, HACCP,

Изучение условий поражения пищевых продуктов, в том числе и специй мицелиальными грибами и оценка возможных способов снижения заспоренности являются важными аспектами проблемы, связанной с повышением качества и безвредности их для потребителя (Ham et al., 2016).

Согласно Врабчева (Vrabcheva, 1998), тропические условия, в которых произрастают пряные травы, способствуют их контаминации плеснеобразующими грибами

и накоплению в них микотоксинов. Среди мицелиальных грибов, в пряных травах, наиболее часто встречаются представители родов *Aspergillus* и *Penicillium*.

Из темноокрашенных гифомицетов вид *Alternaria alternata* наиболее часто поражает перец чили как в период вегетации, так и во время хранения (Pitt, 2000). Согласно Айдину (Aydin A. et al, 2007), недостаточное соблюдение гигиенических условий во время сушки и транспортировки красного перца могут стать причиной развития не только токсигенных грибов, но и патогенных бактерий. Большое влияние на качество перца оказывают также и условия его хранения. Высокая влажность и температура в период хранения приводят к развитию плеснеобразующих грибов, и это повышает вероятность образования и накопления афлатоксинов.

Исследования Руссела и Паттерсона (Russell, Paterson, 2007) были посвящены систематизации болезней красного перца в период вегетации и описанию основных возбудителей, причем основное внимание было уделено вопросу контаминации красного перца афлатоксинами на разных стадиях вегетации и производства. Все образцы красного перца содержали высокий уровень афлатоксина В₁.

Цель работы изучить влияние гигиенических условий производства красного перца на уровень контаминации готового продукта мицелиальными токсигенными грибами.

Материал и методы

Отбор образцов проводился в фермерских хозяйствах Арташатского и Армавирского районов на разных стадиях переработки красного перца, в соответствии с ГОСТом 26669-85, а также согласно NF ISO 7954-93 и ISTA (International Seed Testing Association, 1976).

Для выявления грибов-контаминантов в исследуемых образцах сунели использовали метод серийных разведений, метод непосредственного посева. Для выделения чистых культур мицелиальных грибов использовали питательные среды – глюкозо-дрожжевой агар (М), агар Чапека.

Результаты и обсуждение

Анализ опасностей и критическая контрольная точка (НАССР) - это метод, который используется для контроля процедур обработки пищевых продуктов путем выявления опасностей производства продуктов питания, кроме того, для обеспечения безопасности пищевых продуктов путем контроля опасностей и снижения рисков (Sebnet 2016).

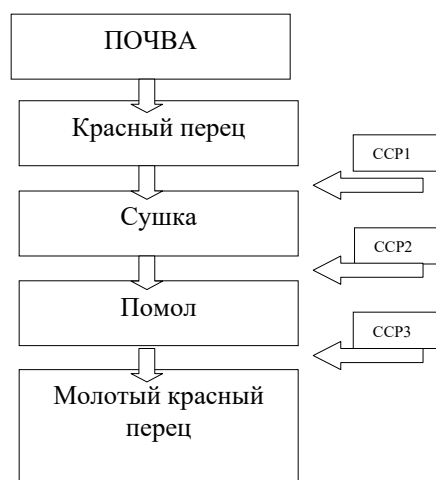
С целью выявления основных источников контаминации молотого красного перца местного производства токсигенными штаммами *A. flavus* – потенциальными продуцентами афлатоксинов, проведен мониторинг сырья в период созревания и сбора урожая, а также на разных стадиях сушки плодов, воздуха и мельницы и молотого красного перца.

На схеме представлены стадии производства красного перца и точки которые являются наиболее опасными для загрязнения красного перца микотоксигенными грибами.

Проведен анализ 20 образцов почвы из-под красного перца. Микологический анализ выявил высокий уровень загрязнения почвы Арташатского района видом *A. flavus* (68%). В образцах почвы из Армавирского района вид *A. flavus* не был обнаружен. Были выделены виды из родов *Aspergillus* и *Alternaria*.

В Армении плоды с признаками механических повреждений, болезней бактериального или грибного происхождения оставляют в поле до полного высыхания для получения молотого красного перца. При анализе 20 образцов перезрелого красного перца из Арташатского и Армавирского районов было выделено 106 штаммов гри-

бов. Изолированные виды микромицетов относятся к четырем родам - *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Stemphylium*. Вид *A. flavus* был обнаружен в 82% исследованных образцов плодов красного перца из Арташатского района и 14% образцов из Армавирского района. Отмечена высокая частота встречаемости темноокрашенных гифомицетов в образцах перца из Армавирского района. Наиболее часто определялись виды из рода *Alternaria*. Род *Cladosporium* представлен одним видом *C. herbarum* и обнаружен в 21% образцов перца. Род *Stemphylium* представлен 2 видами – *S. botryosum* - в 21% и *S. ilicis* - в 14% образцов перца. В образцах красного перца из Армавира доминировали следующие виды из рода *Aspergillus* - *A. niger* в 36% образцов, *A. flavus* – в 14%, *A. ochraceus* в 7%, *A. oryzae* – в 7%.



Следующий технологический этап в производстве красного перца - сушка. В большинстве случаев условия сушки не удовлетворяли гигиеническим требованиям и способствовали дополнительной контаминации продукта плесневыми грибами. В таких условиях перец постоянно загрязняется пылью и грязью. При анализе отобранных образцов из данного места отмечается высокий уровень их контаминации грибами *A. flavus* и *A. niger*. Сушка перца под «открытым небом» часто приводит к увлажнению промежуточного продукта дождевыми осадками, что является причиной вторичного заплесневения. Обычно такое сырье также поступает на помол без тщательной сортировки. При анализе промежуточного продукта, отобранного в процессе сушки, выделено 97 штаммов грибов из родов *Alteranaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*. Вид *A. flavus* был обнаружен в 50% исследованных образцов сушеных красного перца из Арташатского района и 27% образцов из Армавирского района.

Выявлено существенное влияние гигиенического состояния мельниц и производственных помещений, в которых проводится помол, на микологическую безопасность готового продукта. Мельница должна быть размещена в отдельном помещении, с приточной вентиляцией. В Армавирском районе помол перца проводили в негигиенических условиях.

Вид *A. flavus* был обнаружен в 67% исследованных образцов молотого красного перца из Арташатского района и 43% образцов из Армавирского района. В результате токсикологического анализа в 2 изолятах *A. flavus*, выделенных из красного молотого перца Арташатского района, обнаружен афлатоксин В₁.

Проведен анализ воздуха помещения, в котором проводится перемалывание перца. Результаты анализа воздуха показали его высокую степень заспоренности видами рода *Aspergillus* и *Mucor*. Из рода *Aspergillus* идентифицированы виды *A.*

flavus, *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. carbonarius*. Из рода *Mucor* – *M. plumbeus*.

Результаты проведенных анализов на разных стадиях производства молотого красного перца дали возможность выявить основные источники контаминации перца видом *A. flavus* (рисунок 1).

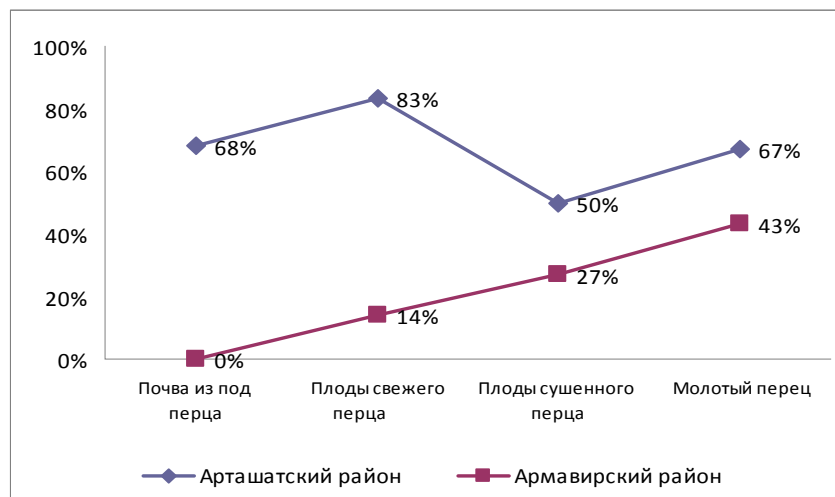


Рисунок 1. Процентное содержание вида *A. flavus* на разных стадиях производства молотого красного перца.

Установлено, что в подавляющем большинстве случаев загрязнение перца темноокрашенными гифомицетами происходит в поле во время вегетации.

Результаты микологического анализа готового продукта показали, что проанализированные образцы наиболее часто загрязняются мицелиальными грибами - потенциальными продуцентами афлатоксинов. Из 17 проанализированных образцов красного перца в 9 образцах содержание афлатоксина В₁ превышало предельно допустимые концентрации и варьировало в пределах от 10 до 50 мкг/кг.

На основании полученных данных составлен план НАССР (План анализа опасностей и критически контрольные точки) для предприятия по производству красного молотого перца. Показано, что гигиеническое состояние мельниц является одной из основных критических точек, которое способствует дополнительному загрязнению молотого перца афлатоксигенными грибами.

Основной причиной высокой контаминированности молотого красного перца – это недостаточное соблюдение гигиенических условий на всех стадиях его производства, упаковки, транспортировки и хранения. При этом немаловажную роль играют погодные условия в период сбора урожая и его сушки. Присутствие токсигенных штаммов грибов в специях представляет также потенциальный риск для пищевых продуктов в республике, в производстве которых они используются в качестве ингредиентов.

Литература

1. ГОСТ 26669-85, Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов, 01.07.1986.
2. Aydin A., Erkan E. M., Başkaya R., Cifcioglu G. Determination of aflatoxin B₁ levels in powdered red pepper // *Food Control* Volume 18. - Issue 9. – 2007. - p.1015-1018.
3. Controle de la qualite des produits alimentaires controle microbiologique. 1993. NF ISO 7954-88. Directives generales pour le denombrement des levures et moisissures.
4. Ham H, Kim S, Kim MH, Lee S, Hong SK, Ryu JG, Lee T. Mycobiota of ground red pepper

-
- and their aflatoxigenic potential. *Microbiol.* 54(12): 832-837, 2016.
5. Pitt J.I. Toxigenic fungi: which are important // *Med. Mycol.*, 38 (Suppl 1), 2000, p.17-22.
 6. Russell R., Paterson M. Aflatoxins contamination in chilli samples from Pakistan // *Food Control.*, 18, 2007, p. 817–820.
 7. Sebnem O.B. A model for implementation of HACCP system for prevention and control of mycotoxins during the production of red dried chili pepper, *Food Science and Technology*, 2016
 8. Vrabcheva, T., Gareis, M., Bresch, H., Bedectel, C., Engel, G., Majerus, P., Rosner, H., Wolff J. Occurrence of ochratoxins A and B in spices and herbs // *Rev. Med Vet.*, 1998, p.533.

Биол. журн. Армении, 1 (69), 2017

ИССЛЕДОВАНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ ТРАВЯНЫХ РАСТЕНИЙ ГОРЫ АРАГАЦ

Т.А. САРГСЯН, М.А. НАВАСАРДЯН, Б.Х. МЕЖУНЦ

Центр эколого-ноосферных исследований НАН Армении
tatevik.sargsyan@cens.am

В статье обобщены результаты исследований содержания хлорофиллов *a, b* и каротиноидов в листьях степных растений, как биологические факторы накопления органического вещества. Установлены средние значения и пределы колебаний пигментов в листьях доминирующих растений и основных луговых групп (злаки, бобовые, разнотравные) кормовых угодий. Показано, что высокие показатели суммы пигментов в листьях пырея и всех исследуемых растительных групп приходится на участок сухостепного пояса, с менее благоприятными условиями среды.

фотосинтетические пигменты – кормовые угодья – травяные растения – злаки – бобовые – разнотравье

Հողվածում ամփոփված են տափաստանային բույսերի տերևներում *ա,բ* բլորոֆիլների ու կարոտինոիդների պարունակության վերաբերյալ հետազոտությունների արդյունքները, որպես օրգանական նյութերի կուտակման կենսաբանական գործոններ: Բացահայտվել են կերահանդակներում գերակշռող տեսակների և հիմնական մարգագետնային բուսախմբերի (*հացազգի, բակլազգի* և *տարախոտեր*) տերևներում պիգմենտների միջին արժեքները և տատանման սահմանները: Ցույց է տրվել, որ սեզի և բոլոր հետազոտված բուսախմբերի տերևներում պիգմենտների գումարային բարձրարժեքներ բաժին են ընկնում չոր տափաստանային գոտու փորձատեղամասին, որտեղ միջավայրի պայմանները նվազ բարենպաստ են:

Ֆոտոսինթետիկ պիգմենտներ – կերահանդակներ –խոտաբույսեր – հացազգի – բակլազգի – տարախոտ

In paper the results of study of chlorophylls *a, b* and carotenoids content in steppe plant leaves as important biological indices of organic matter accumulation are summarized. The mean values and range of variations of pigments in leaves of dominating plants and principle meadow groups (grass, legume, forbs) of grasslands are established. It is shown, that high values sum of pigments in leaves of quack grass and all studied meadow groups fall on the plot of dry steppe zone with less favorable environmental conditions.

photosynthetic pigments – grasslands – herbaceous plants – grass – legume – forbs

В Армении естественные кормовые угодья занимают более 40% всей территории, отличаются богатым видовым составом и представляют основную кормовую базу для животноводства. Исследования последних лет показали, что на большей части этих территорий, особенно на пастбищах степного пояса, значительно снизи-

лась продуктивность и доля высококачественных кормовых растений [5, 7]. Повышение биопродуктивности естественных пастбищ является актуальным вопросом, решение которого требует многостороннего изучения основных факторов роста и накопления биомассы растений. К числу важных биологических параметров относится концентрация фотосинтетических пигментов (хлорофиллов и каротиноидов) в листьях, которые характеризуются сложной химической структурой [2] и ответственны за поглощение энергии солнечных лучей в процессе фотосинтеза растений [8]. При этом, поглощенная хлорофиллами *a* и *b* энергия передается в центр фотохимических реакций непосредственно, а каротиноидами – через хлорофилл *a*. Помимо этого, каротиноиды выполняют также защитные функции, в частности, предотвращают деструктивное фотоокисление органических соединений протоплазмы на свету в присутствии свободного кислорода. Целью данных исследований являлось выявление характера изменений концентрации фотосинтетических пигментов, в связи с условиями мест обитаний и биологическими особенностями видов растений и луговых групп.

Материал и методика.

Исследования проводились в 2015-2016 гг. на кормовых угодьях сельской общины Неркин Саснашен, расположенных на юго-западном склоне г. Арагац. Предварительно были выделены три опытных участка: I участок находился в сухостепном, а II и III – нагорно-степном поясах, соответственно, на высоте 1250, 1500 и 1800 м н.у.м. Отметим, что опытные участки несколько различались по типам почв, растительности, количеству осадков и др. Объектом исследований служили: пырей ползучий (*Agropyron repens* L.), эспарцет лучистый (*Onobrychis radiata* M.B.), молочай Воронова (*Euphorbia Woronowii* Grossh.) и ассоциации с доминированием злаковых, бобовых и разнотравных групп луговых растений. Определение содержания пигментов проводилось по методике, разработанной в Экоцентре специально для полевых исследований [4]. При этом, в качестве растворителя был использован диметилсульфоксид $[(CH_3)_2SO]$, который обеспечивает экстракцию пигментов пластид без предварительного размельчения, а также хранение экстрактов в течение 8 дней при различных температурных режимах. Определение содержания пигментов проводилось на спектрофотометре (СФ-16), показатели которого вносились в формулы Маккини-Арнона и Веттштейна для пересчета в мг/100г сырого образца [9].

Результаты и обсуждение.

На рисунках 1 и 2 представлены экспериментальные данные по содержанию фотосинтетических пигментов в листьях трех видов, которые на опытных участках являются наиболее распространенными представителями растительных ассоциаций. Кривые рисунка 1 показывают, что условия произрастания опытных участков оказыва-

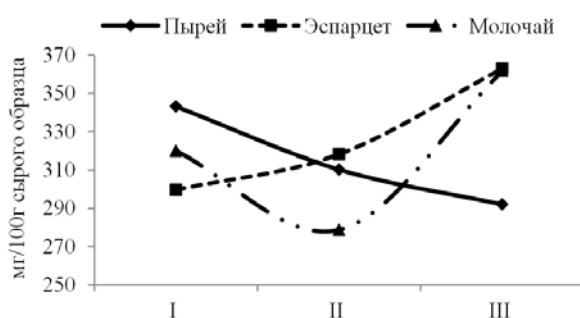


Рис. 1. Действие условий местообитаний на концентрацию фотосинтетических пигментов в листьях доминирующих растений (I, II и III – опытные участки)

ли определенное воздействие на суммарное содержание пигментов в листьях индивидуальных растений. Так, на первом участке содержание пигментов колебалось в пределах 300-340, втором – 280-320, а третьем – 290-360 мг/100г сырого образца. При этом, активный синтез пигментов происходил у растений пырея ползучего на сухостепном участке, а эспарцета лучистого и молочая Воронова – на третьем, который был расположен в условиях нагорно-степного пояса.

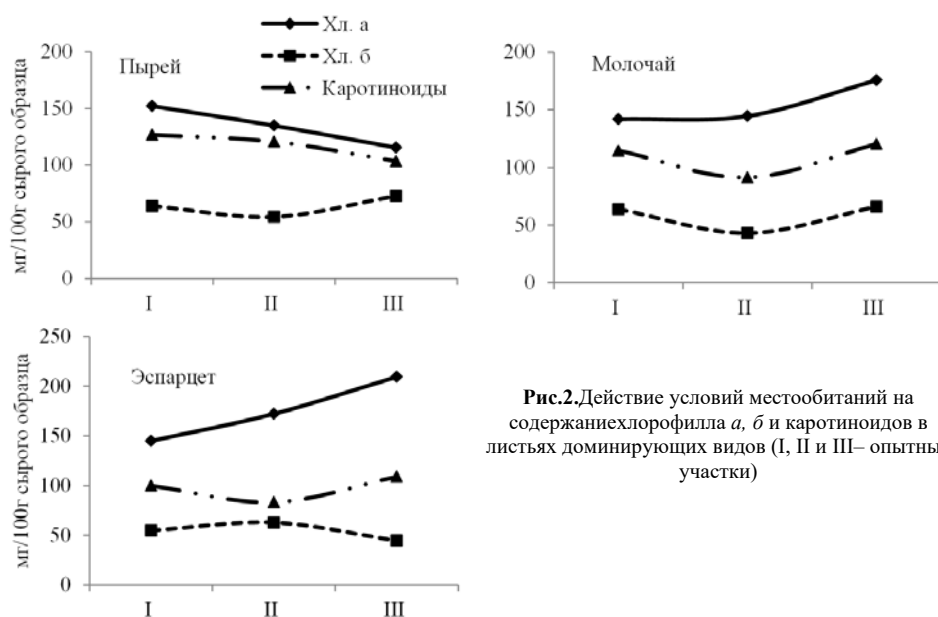


Рис.2. Действие условий местообитаний на содержание хлорофилла *a*, *b* и каротиноидов в листьях доминирующих видов (I, II и III – опытные участки)

Из рисунка 2 видно, что в листьях пырея ползучего концентрация хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов на опытных участках колебалась, соответственно, 116-152, 55-73 и 104-127, эспарцета лучистого *a* – 145-209, 45-63 и 83-109, а молочая Воронова – 142-176, 43-66 и 91-120 мг/100г сырого образца. При этом, максимальное и минимальное содержание хлорофилла *a* обнаружено, соответственно, в листьях эспарцета и пырея, хлорофилла *b* – пырея и молочая, а каротиноидов – пырея и эспарцета. По средним значениям за три участка, содержание хлорофилла *a* в листьях пырея составило 134, эспарцета – 175, молочая – 154 мг/100г сырого образца, хлорофилла *b*, для тех же видов – соответственно: 64; 54; 58; каротиноидов – 117, 97, 109 мг/100г сырого образца. При этом, содержание хлорофилла *a* у пырея снизу вверх по опытным участкам снижается, а молочая и эспарцета, наоборот, повышается. Максимальное и минимальное содержание хлорофилла *a* у пырея обнаружено соответственно на I и III, а у эспарцета и молочая, наоборот, на III и I участках. Некоторая закономерность обнаружена также в изменении содержания каротиноидов: максимальные и минимальные значения обнаружены в листьях пырея на первом и третьем, а эспарцета и молочая – на третьем и втором участках.

В таблице представлены средние данные и пределы колебаний исследуемых пигментов в листьях смешанных образцов злаковых, бобовых и разнотравных растений. Как видно, содержание хлорофилла *a* и *b* у всех растительных групп было выше на первом опытном участке в условиях сухостепного пояса. Минимальное содержание хлорофилла *a* в листьях растений бобовой группы обнаружено на втором, злаковой и разнотравной – третьем участках опыта, находящихся в нагорно-степном поясе. Отметим, что на втором участке было зарегистрировано также наименьшее

количество хлорофилла *b* в листьях всех растительных групп. Содержание каротиноидов в листьях бобовой и разнотравной групп растений было больше в сухостепном, а злаковой–нагорно-степном поясах. Помимо этого, содержание хлорофилла *a* и *b* в листьях разнотравных растений в целом уступало тем же показателям злаковых и бобовых. Обобщая можно сказать, что максимальный суммарный показатель исследуемых пигментов трех групп растений был обнаружен на опытном участке, расположенном в условиях сухостепного пояса. Отметим, что исследованию содержания фотосинтетических пигментов в листьях злаковых, бобовых и разнотравных растений обращено внимание многих ученых, в частности, освещены вопросы, связанные с их колебанием в ходе роста и развития растений, воздействием разных удобрений, водного дефицита, температуры среды и др. [1, 3, 6, 10, 11, 12, 13]. Приведенный литературный материал, в целом, сопоставим с данными, полученными нами в настоящем исследовании. Статистическая обработка экспериментальных данных показала, что величина стандартной ошибки средних выборочных на первом и втором участках опыта почти всегда была ниже 10%, а на третьем участке она часто превышала указанную величину. Показано также, что содержание всех пигментов, независимо от исследуемых растений и условий их произрастания, варьировало в широком диапазоне: содержание хлорофилла *a*, *b* и суммы каротиноидов менялось в пределах 82-236, 24-130 и 56-173 мг/100г сырого образца. Несмотря на такой широкий диапазон вариаций, *t*-test анализ выявил наличие существенной разницы ($P < 0.05$) между некоторыми сравниваемыми показателями, которая более часто регистрировалась для содержания пигментов в листьях бобовых и разнотравных растений, произрастающих на разных участках опыта.

Таблица. Концентрация фотосинтетических пигментов в листьях растений разных луговых групп (мг/100г сырого образца)

Группа луговых растений	Хлорофилла		Хлорофилл <i>b</i>		Сумма каротиноидов	
	среднее	вариация	среднее	вариация	среднее	вариация
I участок (1200 м)						
Злаки	163±9	103-207	88±7	36-130	124±8	56-172
Бобовые	208±10	163-236	90±5	77-110	129±10	97-166
Разнотравье	161±17	113-191	73±7	54-74	142±17	102-173
II участок (1500 м)						
Злаки	158±12	124-204	69±5	48-82	136±7	104-151
Бобовые	145±9	136-154	55±2	53-57	100±6	94-106
Разнотравье	140±7	120-152	46±11	24-74	94±7	82-112
III участок (1700 м)						
Злаки	139±16	94-170	78±5	64-89	100±15	61-131
Бобовые	166±9	149-189	70±9	55-95	90±16	64-131
Разнотравье	115±13	82-176	49±4	35-66	88±8	71-120

Таким образом, двухлетнее исследование показало, что содержание фотосинтетических пигментов в листьях кормовых растений степного пояса г. Арагац имеет большую амплитуду колебаний. Установлено, что эти изменения связаны как с биологическими особенностями растений, так и, в особенности, с условиями их произрастания. В частности, максимальное содержание хлорофилла *a* и суммы пигментов в листьях эспарцета лучистого и молочая Воронова было обнаружено в пункте нагорно-степного, а пырея ползучего – сухостепного поясов, где почвенно-климатические условия были менее благоприятными. Более того, содержание хлорофиллов *a*, *b* и суммы каротиноидов (за одним исключением) у исследуемых растительных групп также достигло максимального значения на данном участке. Статистический анализ подтвердил наличие существенной разницы между некоторыми пигментами в листьях отдельных видов растений и растительных групп, произрастающих на разных участках опыта.

Литература

1. Антипина О.В., Дерябин А.Н., Попов В.Н. Изменение содержания фотосинтетических пигментов при адаптации холодостойких и теплолюбивых растений к низкой температуре. Международный научный журнал “Символ науки”, 1, с. 12-15, 2016.
2. Гюббенет Е.Р. Растение и хлорофилл. М.-Л., изд-во АН СССР, 247 с, 1951.
3. Маслова С.П., Табаленкова Г.Н., Куренкова С.В. Пигментный комплекс многолетних злаков *Bromopsis inermis* и *Phalaroides arundinacea*. Вестник Института Биологии КОМИ Научного центра Уральского отделения РАН, 12, 134, с.4-8, 2008.
4. Межуниц Б.Х., Навасардян М.А. Метод определения содержания хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов в экстрактах листьев растений. Патент на изобретение, № 2439А, Ереван, 2010 (на армянском языке).
5. Межуниц Б.Х., Навасардян М.А., Саргсян Т.А. Состояние пастбищ сухостепной зоны Араратской котловины Армении и пути их оптимизации. Международный научный журнал “Устойчивое развитие горных территорий”, Владикавказ, 3, 5, с. 119-123, 2010.
6. Межуниц Б.Х., Навасардян М.А. Количественная характеристика фотосинтетических пигментов травянистых растений в горных экосистемах Армении. Вестник Тюменского ГУ, 12, с. 220-226, 2012.
7. Межуниц Б.Х., Сагателян А.К., Навасардян М.А. Исследование злаковой формации как важного кормового ресурса горных пастбищ и сенокосов Армении. Межотраслевой институт “Наука и образование”. Научный журнал, Екатеринбург, 3, с. 93-96, 2014.
8. Тарчевский И.А., Андрианова Ю.Е. Содержание пигментов как показатель мощности развития фотосинтетического аппарата у пшеницы. Физиология растений, 27, 2, с.341-347, 1980.
9. Шлык А.А. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев. В кн. “Биохимические методы в физиологии растений”, М., Наука, с. 154-157, 1971.
10. Lobato A., Gonçães-Vidigal M., Filho V., Andrade C., Kvitschalb M., Bonato C. Relationships between leaf pigments and photosynthesis in common bean plants infected by anthracnose. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 38, 1, pp. 29-37, 2010.
11. Nursuaidah H., Motior M.R., Nazia A.M., Islam M.A. Growth and photosynthetic responses of long bean (*Vigna unguiculata*) and mung bean (*Vigna radiata*) response to fertilization. The Journal of Animal & Plant Sciences, 24, 2, pp. 573-578, 2014.
12. Ramak P., Khavarinezhad R.A., Heydari Sh.H., Rafiei M., Khademi K. The effect of water stress on dry weight and photosynthetic pigments in two sainfoin species. Iranian journal “Rangelands and forests plant breeding and genetic research”, 14, 24, pp. 80-91, 2006.
13. Rauzi F., Dobrenz A. Seasonal variation of chlorophyll in western wheatgrass and blue grama. Journal of Range Management, 23, 5, pp. 272-273, 1970.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ ОБМЕНА ПУРИНОВЫХ ОСНОВАНИЙ ДЛЯ МОНИТОРИНГА ЗАГРЯЗНЕНИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Г.Г.СЕМЕРДЖЯН., Г.А.СЕМЕРДЖЯН

gaysemerjyan@ysu.am

Нами изучалось влияние ионов тяжелых металлов (Cu^{++} , Cd^{++}) на активность аденин-деаминазы у 4 представителей моховидных *Pellia epiphylla* (L.) Lindb, *Tortula ruralis* (Hedw) Crome, *Brym capillare* Hedw, *Brachythecium campestre* (Bruch) B.S.G. Из полученных данных можно сделать вывод, что тяжелые металлы даже в незначительных концентрациях влияют на активность фермента адениндеаминазы.

Адениндеаминаза – мохообразные – ионы тяжелых металлов.

Ուսումնասիրվել են մամուռների Bryophyta, Bryaceae, Brachythecium ընտանիքների ներկայացուցիչների մոտ ադենին դեզամինազ ֆերմենտի ակտիվության վրա, ծանր մետաղների (Cu^{++} , Cd^{++}) իոնների ազդեցության պայմաններում: Բացահայտվել են որոշ օրինաչափություններ տարբեր մետաղների ազդեցության և մամուռանմանների տարբեր ներկայացուցիչների վրա:

Ադենինդեզամինազ – մամուռանմաններ – ծանր մետաղների իոններ

Morphological and physiological properties of mosses, along with their wide distribution make these plants very popular bioindicators to assess the state of the environment. Mosses are most effective at concentrating heavy metals and other trace elements. The process of deamination of adenine in homogenates of mossy plants of the family Bryophyta, Bryaceae, Brachythecium campestre was investigated. The effect of metal ions (Cu^{++} , Cd^{++}) for activity of studied enzymes. The ions Cu^{++} , Cd^{++} inhibit the activity of investigated enzyme.

Adenindeaminase – mosses – the ions of heavy metal

Морфологические и физиологические свойства мхов, наряду с широким их распространением (на земном шаре их произрастает от 22000-27000 видов) делают эти растения очень популярными биоиндикаторами для оценки состояния окружающей среды. Мхи эффективно концентрируют большинство тяжелых металлов и других микроэлементов, чувствительны к радиоактивным веществам. Загрязняющие вещества, поступившие в окружающую среду, вызывают развитие стрессовых реакций у растений. Мхи благодаря простоте организации одними из первых реагируют на изменение концентрации поллютантов в окружающей среде, им принадлежит существенная роль в процессах первичного перехватывания и аккумуляирования различных загрязнений. Под влиянием загрязнителей происходит нарушение баланса между механизмами запускающими окислительные реакции, и клеточной антиоксидантной защитой. В результате в тканях повышается концентрация активных форм кислорода, которые вызывают окисление клеточных структур [Рогова и др., 2011; Alison et al., 2012]. Особенностью моховидных является их простое внутреннее и внешнее строение – отсутствие корневой системы, низкий уровень дифференциации тканей. Мхи входят в состав биологической цепочки. Принимая во внимание особенности моховидных, в чрезвычайных условиях их нормальную жизнедеятельность, изменения ядерной ДНК, которая отражает эволюцию типов и стратегию существования, возник вопрос о рассмотрении и объяснении в этих организмах процесса деаминации аденина и аденозина, влияния ионов металлов на активность аденин- и аденозиндеаминазы с точки зрения мониторинга степени загрязненности окружающей среды [Серебрякова, 2007].

Отщепление аминокислот из аминокислот происходит как путем дезаминирования, трансаминирования, так и отщеплением аммиака с вовлечением ряда важных соединений (пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды, триптофан, гистидин, глюкозамин и т.д) в биосинтез, обеспечивая нормальный рост клеток. В литературе отсутствуют данные о дезаминировании азотистых оснований нуклеотидов у мховидных.

Материал и методика

Материалом для исследований послужили образцы сборов мховидных в разных растительных формациях, взятых с разнообразных экотопов Цахкуняцкого хребта и его отрогов. Исследовано 4 вида относящихся к двум классам и разным семействам отдела мховидных.

Нами исследовался процесс дезаминирования у мховидных класса

I. Marschantiopsida (Hepatidiopsida) сем. Pelliaceae, *Pellia epiphylla* (L) Lindb

II. Класс Bryopsida (Musci) ,

1. Сем. Pottiaceae, *Tortula ruralis* (Hedw) Crome

2. Сем. Bryaceae, *Brum capillare*

3. Сем. Brachytecaceae, *Brachythecium campestre* (Bruch.) B.S.G.

Исследуемые мхи промывали в проточной воде, высушивали, тщательно измельчали, проводили 3-часовую экстракцию в 50% спиртовом растворе. Использовали листостебельную часть. Инкубацию проб проводили в условиях фосфатного буфера (рН = 7.4), в качестве субстрата применяли аденин, аденозин, инкубацию проводили в термостате при температуре 37°, в течение 1 часа 30 мин. Активность фермента определяли микродиффузионным методом Зелингсона в модификации Силаковой и сотрудников [1962]. Принцип метода заключается в вытеснении аммиака из исследуемой жидкости, находящейся в герметически закупоренных сосудах, вращающихся на ротаторе со скоростью 60-70 об/мин, с помощью насыщенного раствора КОН и в последующей его абсорбции на стеклянных палочках, предварительно смоченных 1N серной кислотой. Через 45 мин. их промывали водой и в элюате определяли аммиак колориметрическим методом с помощью реактива Несслера. Интенсивность окраски измеряли на фотоэлектроколориметре при длине волны 440 нм. При составлении калибровочной кривой использовали стандартные растворы сернистого аммония.

Результаты и обсуждение.

В некоторых организмах аденин путем гидролиза при действии ферментов аденидезаминазы расщепляется на аммиак и гипоксантин. Отщепление аминокислот из аминокислот происходит как путем дезаминирования, трансаминирования, так и высвобождением аммиака, который вовлекается в биосинтез ряда важных соединений (пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды, триптофан, гистидин, глюкозамин и др.) обеспечивающих нормальный рост клеток.

В литературе отсутствуют данные о дезаминировании аминокислот, азотистых оснований нуклеотидов, а также относительно ферментативных систем обеспечивающих эти реакции у мхообразных. Следует отметить, что мхообразные способны накапливать тяжелые металлы. Загрязнение окружающей среды – это один из первоочередных вопросов современного человечества. Одним из наиболее существенных факторов загрязнения среды являются химические вещества, которые способны вызывать нарушения и разрушения биосферы. К числу особенно опасных загрязнителей химического характера относятся тяжелые металлы. Для них

характерны высокая токсичность, мутагенный и канцерогенный эффекты. Тяжелые металлы опасны тем, что способны накапливаться в живых организмах и передаваться по пищевым цепям. Таким образом, в зоне особой опасности находится человек, который как правило, возглавляет эти цепи, а следовательно, получает наибольшее количество токсичных веществ. В связи с вышеуказанными причинами возникает необходимость в регулярном контроле за состоянием окружающей среды на предмет содержания тяжелых металлов и других токсичных элементов для оценки загрязнения. Исходя из мирового опыта, для биоиндикационных целей достаточно хорошо подходят мохообразные [Harmens. H. 2010; Gadzolis et all. 2016].

Нами изучалось влияние ионов тяжелых металлов (Cu^{++} , Cd^{++}) на активность адениндезаминазы у 4 представителей моховидных *Pellia epiphylla* (L.) Lindb, *Tortula ruralis* (Hedw) Crome, *Brym capillare* Hedw, *Brachythecium campestre* (Bruch) B.S.G.

При исследовании влияния ионов Cd^{++} на активность адениндезаминазы наблюдается следующая закономерность: у представителя семейства *Fossombroniaceae* *Pellia epiphylla* (L.) Lindb, семейства *Pottiaceae* *Tortula ruralis* (Hedw) Crome наблюдается 95% ингибирование исследуемого фермента, а у представителей семейств *Bryaceae* и *Brachytheciaceae* фермент ингибируется на 67%, а при концентрации ионов Cd^{++} в 5.0 мМ во всех исследуемых мхах происходит полное ингибирование активности фермента адениндезаминазы. Далее исследовалось влияние ионов Cu^{++} на активность фермента адениндезаминазы. У *Pellia epiphylla* (L.)Lindb при концентрации ионов Cu^{++} в 2.5 мМ наблюдается почти 95% ингибирование активности исследуемого фермента, у *Tortula ruralis* (Hedw) Crome – 70% ингибирование, а у *Brym Capillare* Hedw на 85%.

Таблица1. Влияние ионов Cd^{++} на активность адениндезаминазы у различных представителей моховидных (активность выражена в мкмольх на 1г свежей ткани. Приведены также % активности проб без добавления ионов, n=3, p<0.05)

Объект	Концентрация ионов Cd , mM											
	0.00		0.25		0.5		1.0		2.5		5.0	
	активность	%	активность	%	активность	%	активность	%	активность	%	актив-ность	%
<i>Pellia epiphylla</i> (L.)Lindb	10.35±0.02	100	9.40±0.1	90.8	6.2±0.03	59.9	3.0±0.0.01	28.9	0.5±0.01	4.83	-	-
<i>Tortula ruralis</i> (Hedw) Crome	28.40±0.01	100	25.8±0.2	90.8	20.03±0.4	71.4	13.5±0.2	47.5	1.0±0.02	3.52	-	-
<i>Brum capillare</i> (Hedw)	15.34±0.1	100	13.3±0.01	86.7	10.1±0.01	65.8	8.3±0.4	54.1	3.3±0.01	21.5	-	-
<i>Brachythecium campestre</i> (Bruch.)B.S.G	20.50±0.3	100	17.2±0.14	83.9	13.0±0.2	63.41	10.±0.1	48.7	6.7±0.03	32.6	-	-

Таблица 2. Влияние ионов Cu^{++} на активность адениндезаминазы у различных представителей моховидных (активность выражена в мкмольх на 1г свежей ткани. Приведены также % активности проб без добавления ионов, $n=3$, $p<0.05$)

Объект	Концентрация ионов Cu , мМ											
	0.00		0.25		0.5		1.0		2.5		5.0	
	активность	%	активность	%	активность	%	активность	%	активность	%	активность	%
<i>Pellia epiphylla</i> (L.) Lindb	10.35±0.02	100	8.47±0.01	81.8	7.97±0.03	77.0	3.47±0.01	33.5	0.47±0.05	4.54	-	-
<i>Tortula ruralis</i> (Hedw) Crome	28.40±0.01	100	26.52±0.10	93.3	23.02±0.4	81.0	20.52±0.2	72.2	16.52±0.01	58.16	12.10±0.03	42.6
<i>Brum capillare</i> (Hedw)	15.34±0.1	100	13.46±0.03	87.7	12.96±0.2	84.4	8.46±0.13	55.1	4.03±0.04	26.2	1.10±0.2	13.68
<i>Brachythecium campestre</i> (Bruch.) B.S.G	20.50±0.3	100	18.62±0.01	90.8	17.12±0.01	88.7	13.62±0.03	66.4	10.03±0.18	50.24	6.02±0.10	29.3

Таким образом исходя из полученных данных можно сделать вывод, что тяжелые металлы даже в незначительных концентрациях влияют на активность фермента дезаминирующего аденин. Определение активности фермента в исследуемых моховидных можно использовать как тест при определении степени загрязнения окружающей среды, что очень важно при экологическом мониторинге загрязнении окружающей среды тяжелыми металлами.

Литература

1. Рогова Н.С., Рыжакова Н.К., Борисенко А.Л., Меркулов В.Г. Изучение аккумуляционных свойств мхов, используемых при мониторинге загрязнения атмосферы. «Оптика атмосферы и океана», 24, N1, 2011.
2. Серебрякова Н.Н. Влияние ксенобиотиков на физиологию и биохимию листовых мхов. 2007.
3. Силакова А.С., Труш Г.П., Являкова А.А. Микрометод определения аммиака и глутамина в тканевых трихлоруксусных экстрактах. Вopr. Мед. Химии. N5, стр.538. 1962.
4. Alison W. Roberts., Eric M. Roberts and Candance H.Haigler. Moss cell walls: structure and biosynthesis. Frontiers in plant science, mini review article, 2012.
5. Gatzolis D., Jovan S., Donovan G., Amacher M., Monleon V. Elemental atmospheric pollution assessment via moss-based measurements in Portland, Oregon. Pacific Northwest Research Station, General Technical Report, June 2016.
6. Harmens. H. 2010. Monitoring of atmospheric deposition of heavy metals, nitrogen and pops in Europe using bryophytes. [monitoring manual 2010 survey]. [online]: Available from Internet.

**ВЛИЯНИЕ СОВМЕСТНОГО ПРИМЕНЕНИЯ ГАМК И
БЕНТОНИТА НА СОДЕРЖАНИЕ НЕЙРОАКТИВНЫХ
АМИНОКИСЛОТ В ОРГАНАХ И ГЛЮКОЗЫ В КРОВИ
КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ
АЛЛОКСАНОВОМ ДИАБЕТЕ**

ТАРОЯН С.К., ВАРДАНИЯН.Г., ХАЧАТРЯН Р.С., КАМАЛЯН Р.Г.

*Институт биохимии им. Г.Бунятыана НАН РА
sirarpy.taroyan@mail.ru*

Внутрибрюшинное введение крысам ГАМК и одновременное скармливание животным бентонита способствует ослаблению диabetогенного действия аллоксана, однако не снимает полностью его гипергликемический эффект. ГАМК и бентонит в отдельности оказывают менее выраженное действие. Введение ГАМК сопровождается повышением ее уровня в поджелудочной железе, но не в мозге. Скармливание бентонита достоверно снижает содержание дикарбоновых аминокислот в органах крыс и препятствует повышению уровня ГАМК в поджелудочной железе животных, одновременно получавших эту аминокислоту. Полученные данные свидетельствуют об умеренном протективном антидиабетогенном действии совместного применения бентонита и ГАМК.

Аллоксан-диабет- бентонит-ГАМК-мозг-поджелудочная железа.

ԳԱԿԹ-ի ներորովայնային ներարկումը և բենտոնիտի միաժամանակ կերակրումը առնետների նպաստում է ալոքսանի դիաբետոգեն ազդեցության թուլացմանը, սակայն լիովին չի կանխում վերջինիս հիպերգլիկեմիկ ազդեցությունը: ԳԱԿԹ-ը և բենտոնիտը առանձին ավելի թույլ ազդեցություն են դրսևորում: ԳԱԿԹ-ի ներարկումը զուգորդվում է նրա պարունակության բարձրացմամբ ենթաստամոքսային գեղձում, բայց ոչ ուղեղում: Բենտոնիտը իջեցնում է երկկարբոն ամինաթթուների մակարդակը առնետների օրգաններում և կանխում է ԳԱԿԹ-ի կոնցենտրացիայի աճը ԳԱԿԹ և բենտոնիտ ստացող կենդանիների ենթաստամոքսային գեղձում: Ստացված տվյալները վկայում են բենտոնիտի և ԳԱԿԹ-ի համատեղ օգտագործման չափավոր հակադիաբետոգեն ազդեցության մասին:

Ալոքսան-դիաբետ-բենտոնիտ-ԳԱԿԹ-ուղեղ-ենթաստամոքսային գեղձ

GABA intraperitoneal injection to rat and simultaneously feeding of bentonit promote attenuation the diabetogen action of alloxan, but don't remove completely its hyperglycemic effect. GABA and bentonit separately show less pronounced action. GABA injection is attend by the increase its level in pancreas but not in the brain. Bentonit feeding decreases concentration of dicarboxylic amino acids in rat organs and protect GABA level increase in pancreas of rat, received this amino acid simultaneously with bentonit. The data obtained testify to modest protect antidiabetic action of combined using of GABA and bentonit.

Alloxan-diabet- bentonit- GABA -brain-pancreas

Хорошо известна роль ГАМК как мощного ингибиторного транмиссера нервной деятельности. Тормозное действие ГАМК распространяется и на другие ткани и органы, в частности иммунную систему и поджелудочную железу [10,12,13]. Иммунные клетки, содержащие глутаматные и ГАМК рецепторы [11,14], не обходятся без предшественника этих нейротрансмиттерных аминокислот глутамина, который помимо генерации вышеуказанных аминокислот, необходим им как источник энергии, азота и углерода [12]. Аналогичное наблюдается и с поджелудочной железой, которая содержит нейроактивные аминокислоты в количествах, сопоставимых с мозгом [5,7,13]. ГАМК усиливает синтез и секрецию инсулина β -клетками и подав-

ляет аналогичные процессы в α - и δ -клетках, касающиеся глюкагона и соматостатина [13]. Считается, что введение ГАМК ограничивает патогенные аутоиммунные ответы, индуцируемые проинсулином, и способствует усилению им же вызванных регуляторных ответов [15]. Авторы считают, что совместное действие проинсулина и ГАМК может синергично подавлять воспаление и способствовать восстановлению нормогликемии. Необходимо отметить, что в лечении диабета большую роль играют строгая диета и соответствующая кишечная микрофлора, которая влияет на иммунный статус организма [8]. Состав кишечной флоры существенно влияет на состояние жирового обмена организма и развитие диабета [9]. По данным авторов пересадка микрофлоры здоровых людей диабетикам способствует их излечению. Бентонит влияет на состав микрофлоры желудочно-кишечного тракта, связывает различные токсины, способствует усвоению пищи [1]. В этом плане совместное применение бентонита в качестве минеральной подкормки и ГАМК или генерирующих ее веществ может усилить противовоспалительные иммунные ответы и ослабить воспалительные. Подобный подход может, на наш взгляд, способствовать предупреждению или задержке развития сахарного диабета.

Материал и методы

Исследования были проведены на белых крысах массой 180-200г, содержащихся на обычном рационе в условиях вивария института биохимии НАН РА. Животные были разделены на 4 группы по 5 в каждой: 1-ая контрольная получала внутрибрюшинно 0.5мл физиологического раствора, 2-ая-25мг/кг ГАМК, через день в течение 10 дней, 3-ая-1% бентонита в корме в течение 10 дней, 4-ая-бентонит ежедневно+ГАМК через день. Через 5 дней животным внутрибрюшинно вводили аллоксан в дозе 150мг/кг и через 2 суток забивали под легким эфирным наркозом, удаляли панкреас и мозг, в которых определяли аминокислоты семейства глутамина. Экстракцию аминокислот осуществляли 6% HClO_4 . Разделение аминокислот в перхлоратных экстрактах осуществляли методом высоковольтного электрофореза в пиридин-ацетатном буфере, pH 3.9, аминокислоты определяли нингидриновым методом [2]. Глутамин определяли в электрофоретической фракции нейтральных аминокислот по амидному азоту с использованием микродиффузионного метода [4]. Глюкозу крови определяли с помощью глюкометра Ассу-Чек (Германия).

Результаты и обсуждение

В таблице 1 представлено содержание аминокислот в панкреасе крыс. Как видно пятикратное введение ГАМК крысам способствует ее накоплению в панкреасе и внутрибрюшинная инъекция аллоксана не влияет на этот процесс. Регистрируется достоверное уменьшение содержания аспартата и глутамата после инъекции аллоксана на фоне 5-дневного скармливания животным бентонита.

Таблица 1. Влияние аллоксана на содержание нейроактивных аминокислот в панкреасе крыс, получавших бентонит и ГАМК

Группы	АК	ГК	ГН	ГАМК
Контроль	1.36 0.91 $\pm$ 0.09	2.61 $\pm$ 0.37	4.74 $\pm$ 0.43	1.07 $\pm$ 0.25
ГАМК	1.42 0.95 $\pm$ 0.35	3.19 $\pm$ 0.44	4.68 $\pm$ 0.22	3.45 $\pm$ 0.30*
Бентонит	1.05 0.70 $\pm$ 0.09*	1.93 $\pm$ 0.27*	5.17 $\pm$ 0.41	1.02 $\pm$ 0.11
ГАМК+бентонит	1.36 0.91 $\pm$ 0.11	3.00 $\pm$ 0.23	4.54 $\pm$ 0.49	1.15 $\pm$ 0.14

Примечание: Аллоксан вводили крысам внутрибрюшинно на 5-ый день после скармливания им бентонита (1% корма) и внутрибрюшинного введения ГАМК (20мг/кг)

Содержание аминокислот в таблицах дано в мкмоль/г свежей ткани, n=5

Представленные в таблице 2 результаты свидетельствуют о том, что внутрибрюшинное введение ГАМК не сопровождается повышением ее концентрации в мозге, однако скормливание бентонита достоверно снижает концентрацию глутамата и аспартата. Подобная картина может быть связана как возможным связыванием дикарбоновых аминокислот бентонитом, так и с их неспособностью, а также ГАМК, преодолевать гемато-энцефалический барьер.

Таблица 2. Влияние аллоксана на содержание нейроактивных аминокислот в мозге крыс, получавших бентонит и ГАМК

Группы	АК	ГК	ГН	ГАМК
Контроль	2.74±0.23	6.79±0.45	5.44±0.52	1.61±0.34
ГАМК	2.43±0.18	5.65±0.17	4.68±0.20	1.61±0.27
Бентонит	1.93±0.13*	5.61±0.37*	5.45±0.41	1.88±0.23
ГАМК+бентонит	2.37±0.22	5.33±0.44	5.18±0.36	1.52±0.38

Таблица 3. Влияние аллоксана на содержание глюкозы в крови крыс, получавших бентонит и ГАМК

Группы	Глюкоза ммоль/л
Контроль	34.8±3.6
ГАМК	27.9 ±3.4
Бентонит	25.3±2.8*
ГАМК+бентонит	20.8±2.5*

В таблице 3 представлены результаты определения глюкозы в крови. Необходимо отметить, что в отличие от прежних наших опытов по предотвращению предварительно введенным ингибитором ГАМК-трансаминазы этаноламин-О-сульфатом повышения концентрации глюкозы диабетогеном аллоксаном, в настоящих опытах введение самой ГАМК проявляет лишь статистически недостоверную тенденцию снижения уровня глюкозы. Необходимо отметить, что противогликемический эффект этаноламин-О-сульфата при стрептозотоциновом экспериментальном диабете был достоверен, но менее выражен [3]. Скармливание бентонита, а также, в особенности, одновременное введение ГАМК приводит к более выраженному статистически значимому ослаблению действия аллоксана. Однако нормализации уровня глюкозы под действием исследованных соединений не происходит, что не совсем согласуется с мнением о возможности регенерации островковых β-клеток и секреции инсулина под действием ГАМК и регуляции ею аутоиммунной реакции [15]. Можно предположить, что химические модели экспериментального сахарного диабета I типа не вполне соответствуют патогенезу этой болезни.

Литература

1. Аракелян Ф.Р., Арутюнян Э.Я., Камалян Р.Г. К механизму действия бентонитовой глины у жвачных. Тезисы докладов научн. конфер. Ереван. зоовет. инст., 1988, 22-23.
2. Камалян Р.Г., Мовсесян С.Г. Вopr. биохимии мозга. Изд.АН Арм ССР, 2, с. 40-48,1966.
3. Камалян Р. Г., Арутюнян А.А., Хачатрян Н.Х., Варданян А. Г., Тароян С.Г. Влияние ГАМК-генерирующих факторов на содержание нейроактивных аминокислот в органах

крыс при экспериментальном стрептозотоциновом диабете. Мед. Наука Армении, LV, N 4, 32-42, 2015.

4. Силакова А.И., Труш Г.П., Являкова А. Микрометод определения аммиака и глутамина в тканевых ТХУ экстрактах. Вопр.мед.химии, 5, с. 538-542, 1962.
5. Atkinson M.A., Maclaren N.K., Sharp D.W., Lacy P.E., Riley W.J. 64000 Mr autoantibodies as predictors of insulin-dependent diabetes. Lancet, v. 335, p. 1357-1360, 1990.
6. Bhat R., Axtel R., Miranda M., Lock C., Tsien R.W., Steinman L. Inhibitory role for GABA in autoimmune inflammation. Proc. Natl. Acad. Sci., USA. 2010, v. 107, p. 2880-2885.
7. Braun M. et al., GABA is an autocrine excitatory transmitter in human pancreatic β -cells. Diabetes, 59, 1694-1701, 2010.
8. Cani P.D., Bibiloni R., Knauf C., Waget A., Neyrinck A.M., Delzenne N.M., Burcelin R. Change in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. Diabetes. 2008, 57(6), 1470-1481.
9. Cani P.D., Amar J., Iglesias M.A. et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. Diabetes. 2007, 56(7), 1761-1772.
10. Garry D.J., Coulter H.D., Mc Intee T.J., Wu J.Y., Sorenson R.L. Immunoreactive GABA-T within the pancreatic islets localized in mitochondria in the β -cell. J. Histochem.Cytochem. v.35, p. 831-836, 1987.
11. Kostanyan I.A., Merkulova M.I., Novolotskaya E.V., Nurieva R.I. Study of interaction between L-glutamate and human blood lymphocytes// Immunol. Lett., 1997 - 58(3) - P. 177-180.
Newsholme P. Why Is L-Glutamine Metabolism Important to Cells of the Immune System in Health, Postinjury, Surgery or Infection?// J. Nutrition, 2001-131 - 2515S-2522S.
12. Sorenson R.L., Garry D.G., Brelje T. C. Structural and functional considerations of GABA in islets of Langerhans. Diabetes., v.40, p. 1365-1374, 1991.
13. Tian J., Chau C., Hales T.G. et al. GABAA receptors mediate inhibition of T cell responses J.Neuroimmunol., 1999 - 96 - P. 21-28. 21. Tian J., Kaufman D.L. Antigen-based therapy for the treatment of type 1 diabetes. Diabetes. 58, 1939-1946, 2009.
14. Tian J., Dang H., Nguyen An V., Chen Z., Kaufman D.L. Combined therapy with GABA and proinsulin/alum acts synergistically to restore longterm normoglycemia by modulating T-cell autoimmunity and promoting β -cell replication in newly diabetic NOD mice. Diabetes, v.63, no.9, 3128-3134, 2014.

Биолог. журн. Армении, 1 (69), 2017

ВЛИЯНИЕ ДЛИНЫ АЛКИЛЬНОЙ ЦЕПИ ПОВЕРХНОСТНО АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА УСТОЙЧИВОСТЬ БИСЛОЙНОЙ ЛИПИДНОЙ МЕМБРАНЫ

Л. А. ТОНОЯН

*Ереванский государственный университет, кафедра молекулярной физики
lilittonoyan.ysu@gmail.com*

В работе исследовано влияние анионоактивных поверхностно-активных веществ: лаурилсульфата натрия ($C_{12}H_{25}SO_4Na$), пентадецил сульфата натрия ($C_{15}H_{31}SO_4Na$) и лауретсульфата натрия ($C_{18}H_{37}SO_7Na$) на устойчивость бислойной липидной мембраны в электрическом поле. Показано, что с увеличением длины алкильной цепи поверхностно активного вещества устойчивость БЛМ в электрическом поле уменьшается.

Поверхностно-активные вещества (ПАВ) — органические соединения, имеющие амфифильное строение, то есть их молекулы имеют в своём составе полярную часть, гидрофильный компонент и неполярную (углеводородную) часть, гидрофобный компонент. Эффективная форма молекул ПАВ представляет из себя “клин” (конус), т.е. эти молекулы имеют относительно широкую полярную головку и узкий углеводородный хвост. В силу интенсивного использования и выброса в окружающую среду, объёмы загрязнения водных объектов ПАВ-ами идет с катастрофической быстротой [3]. ПАВ имеют свойство впитываться и накапливаться в организме, вызывая нарушения в центрально-нервной, сердечно-сосудистой, пищеварительной системах, повреждает органы выделительной системы. Обладают аллергенным свойством, при даже маленьком количестве попадания в организм. Они токсичны для рыб и для других животных [5,8].

В данной работе изучено влияние анионоактивных поверхностно-активных веществ: лаурилсульфата натрия ($C_{12}H_{25}SO_4Na$), пентадецил сульфата натрия ($C_{15}H_{31}SO_4Na$) и лауретсульфата натрия ($C_{12+2n}H_{25+4n}NaO_{4+n}S$ $n=3$ / $C_{18}H_{37}SO_7Na$) на бислойную липидную мембрану (БЛМ).

Лаурилсульфат натрия (додецилсульфат натрия) (рис.1а) является одним из часто применяющимся детергентом для солюбилизации мембран, для изолирования и очищения мембранных белков [9]. Принадлежит к раздражающим, но не канцерогенным веществам. Критическая концентрация мицеллообразования (ККМ) составляет $8,2 \times 10^{-3}$ М. Пентадецил сульфат натрия (рис. 1б) относится к классу алкилсульфатов. ККМ составляет $1,03 \times 10^{-3}$ М [3]. Лауретсульфат натрия (рис. 1в) широко применяемых в качестве моющих средств. Действует менее раздражающе, чем лаурилсульфат натрия. ККМ составляет 5×10^{-4} М.

По вышесказанным причинам, и учитывая тот факт, что внутри клетки часто встречаются молекулы по своей структуре похожие на ПАВ (такие как жирные кислоты, лизоформы фосфолипидов), необходимо знать их действие на устойчивость мембран.

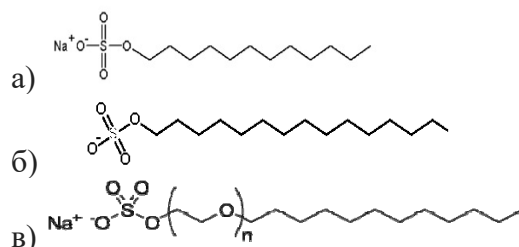


Рис. 1 Химические структуры а) лаурилсульфат натрия, б) пентадецил сульфат натрия, в) лауретсульфат натрия (n=3).

Но поскольку изучение устойчивости на живой клетке чрезвычайно сложно, то представляется целесообразным их детальное исследование на широко используемой экспериментальной системе для моделирования клеточных мембран, которым являются плоские бислойные липидные мембраны.

Материалы и методы

Для изготовления мембран использовались липиды фосфатидилсерин (1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-[Phospho-L-Serine]) и фосфатидилэтаноламин (1,2-Diphytanoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanol amine) (1:1) приобретенные из “Avanti Polar Lipids” (USA). Для формирования БЛМ применялись 3-4% свежеприготовленный раствор

липидов в н-декане. В качестве буферного раствора применялся 0.1 М NaCl, в дистиллированной воде. Мембраны формировались по методу Мюллера-Рудина в растворе электролита на отверстии с диаметром 1 мм (площадь БЛМ - $S=0,64\text{мм}^2$) в тефлоновой тонкой перегородке [7]. Все опыты проводились при комнатных температурах (20-25°C). Влияние длины алкильной цепи ПАВ на БЛМ было рассмотрено при концентрации 10^{-4}М .

Для измерения электрических параметров БЛМ - проводимость и электрическую емкость, в два отсека рабочей ячейки, разделенные мембраной, помещались два хлорсеребряных электрода, которые были подключены к АЦП (Е14-140-М) и контролировались компьютером с использованием компьютерной программы LabVIEW, в соответствии с процедурой, описанной в [6]. Диапазон подаваемой на БЛМ разности потенциалов был от 0.20 В до 0.45 В.

Результаты и обсуждение

БЛМ весьма нестабильна в присутствии небольших количеств детергентов и других примесей [10]. Устойчивость мембраны можно охарактеризовать средним временем жизни мембраны. Согласно [1,2] выражение для среднего времени жизни БЛМ во внешнем электрическом поле имеет вид:

$$\bar{t} = \frac{(k_b T)^{3/2}}{4\pi D c_0 S \gamma \left(\sigma + \frac{C \varphi^2}{2} \right)^{1/2}} \cdot \exp \left(\frac{\pi \gamma^2}{\left(\sigma + \frac{C \varphi^2}{2} \right) k_b T} \right) \quad (1)$$

где σ – натяжение БЛМ, γ – линейное натяжение кромки поры в БЛМ; D – коэффициент диффузии дефектов в пространстве радиусов; φ – разность потенциалов на мембране; k_b – постоянная Больцмана, T – температура; c_0 – концентрация пор на БЛМ и S – площадь БЛМ; C – приведенная электрическая емкость, которая определяется соотношением $C = C_0 (\varepsilon_w / \varepsilon_m - 1)$, где $C_0 = \varepsilon_0 \varepsilon_m / h$ – удельная электрическая емкость БЛМ, ε_w – диэлектрическая проницаемость воды, ε_m – диэлектрическая проницаемость БЛМ, ε_0 – электрическая постоянная.

Было исследовано влияние длины алкильной цепи поверхностно активных веществ (C_{12} - C_{18}) на время жизни мембран во внешнем электрическом поле, при заданных значениях разности потенциалов на БЛМ. К БЛМ прикладывалось постоянное напряжение (от 0,2В до 0,45В) и измерялся ток через мембрану. Момент лавинообразного увеличения тока свидетельствовал о разрушении мембраны в результате ее электрического пробоя. Строилась зависимость десятичного логарифма среднего времени жизни, от приложенного напряжения.

На рис. 2 приведены зависимости десятичного логарифма среднего времени жизни мембран от приложенного напряжения, построенные 1- пви отсутствии ПАВ, 2 – при присутствии лаурилсульфата натрия в концентрации 10^{-4} М, 3 – пви присутствии пентадецил сульфат натрия в концентрации 10^{-4} М, 4- пви присутствии лауретсульфата натрия в концентрации 10^{-4} М.

Из полученных кривых (рис.2) видно, что увеличение длины алкильной цепи ПАВ вызывало уменьшения стабильности мембран. Из параметров, влияющие на среднее время жизни БЛМ согласно (1), наиболее важными являются линейное натяжение кромки поры γ , разность потенциалов на мембране φ , натяжение σ и $D c_0 S$, т.е. произведение общего количества дефектов в мембране на коэффициент

диффузии дефекта в пространстве радиусов. Были определены значения σ , γ , Dc_0S . Анализ формулы (1) показывает, что среднее время жизни БЛМ наиболее сильно зависит от линейного натяжения кромки поры γ , поскольку эта зависимость экспоненциальная.

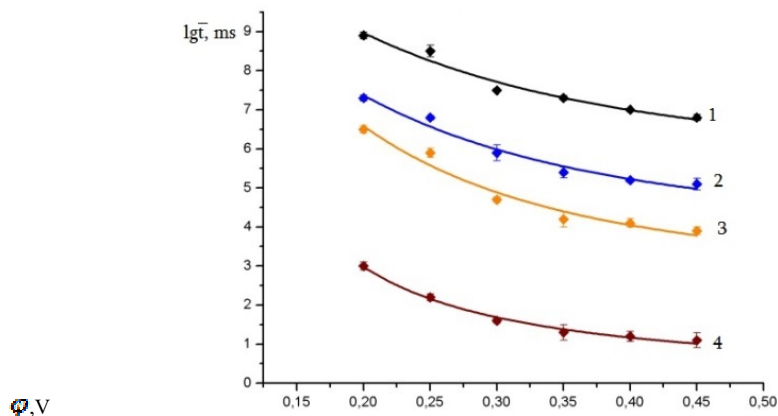


Рис.2. Уменьшение среднего времени жизни БЛМ при увеличении разности потенциалов: 1 – при отсутствии ПАВ, 2 – при присутствии лаурилсульфата натрия, 3 – при присутствии пентадецил сульфат натрия, 4– при присутствии лауретсульфата натрия. Точки – экспериментальные данные (среднее из 5 измерений при каждой разности потенциалов), сплошные линии – теоретические кривые, проведенные методом наименьших квадратов, по формуле (1).

Таблица 1. Рассчитанные значения параметров поверхностного натяжения (σ), линейного натяжения спонтанно образующихся пор (γ) и произведение общего количества дефектов в мембране на коэффициент диффузии дефекта в пространстве радиусов Dc_0S .

	σ (Н/м)	γ (Н)	Dc_0S (м ² /с)
Контроль (при отсутствии ПАВ)	4.3×10^{-3}	6.8×10^{-12}	3.1×10^{-25}
присутствии 10^{-4} М лаурилсульфата натрия (C_{12})	2.7×10^{-3}	4.8×10^{-12}	23×10^{-23}
присутствии 10^{-4} М пентадецил сульфат натрия (C_{15})	2.2×10^{-3}	3.2×10^{-12}	267×10^{-23}
присутствии 10^{-4} М лауретсульфата натрия (C_{18})	1.72×10^{-3}	1.9×10^{-12}	423×10^{-23}

Как видно из таблицы 1, уменьшение значения γ , как и следовало ожидать, коррелирует с уменьшением среднего времени жизни БЛМ. Таким образом, с увеличением длины алкильной цепи поверхностноактивного вещества уменьшается значение линейного натяжения кромки поры в БЛМ. Из таблицы 1 видно также, что натяжение σ также уменьшается с ростом длины алкильной цепи поверхностно активного вещества. Такое согласованное поведение σ и γ также ожидаемо, поскольку существует приближенное линейное соотношение между натяжением БЛМ и линейным натяжением кромки поры в БЛМ [1,2]. Из таблицы 1 видно, что с увеличением длины алкильной цепи поверхностно активного вещества, увеличивается значение параметра Dc_0S . Физически это легко объяснить. Поскольку в этих условиях наблюдается уменьшение γ , то согласно теории устойчивости БЛМ в электрическом поле [1,2], это неизбежно приведет к увеличению числа пор на БЛМ, а это в свою очередь к увеличению параметра Dc_0S .

Таким образом, в данной работе показано, что с увеличением длины алкильной цепи поверхностно активного вещества от C₁₂ до C₁₈ устойчивость БЛМ в электрическом поле уменьшается.

Литература

1. Абидор И.Г., Аракелян В.Б., Пастушенко В.Ф., Тарасевич М.П., Черномордик Л.В., Чизмаджев Ю.А. Электрический пробой бислойных липидных мембран // ДАН СССР, т. 240, № 3, с. 733-736, 1978.
2. Абидор И.Г., Аракелян В.Б., Пастушенко В.Ф., Черномордик Л.В., Чизмаджев Ю.А. Механизм электрического пробоя БЛМ // ДАН СССР, т. 245, №5, 1239-1242, 1979.
3. Коротких О. П., Кочурова Н. Н., Виноградова М. С., Абдулин Н. Г., Гермашева И. И. Изучение поверхностных свойств водных растворов пентадецилсульфата натрия. Вестник СПбГУ. сер. 4, вып. 3, с. 77-81, 2010.
4. Равдель А. А., Пономарёва А. М. Краткий справочник физико-химических величин., С. 232, 1983.
5. Chaturvedi V., Kumar A.. Toxicity of sodium dodecyl sulfate in fishes and animals. International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology. v. I: Issue-2, p. 630-633, 2010
6. Gu L., Wang I., Xun J., Ottova-Leitmannova A., Tien H.T. A new method for the determination of electrical properties of supported bilayer lipid membranes by cyclic voltammetry. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, v. 39, p. 275–283, 1996.
7. Mueller P., Rudin D.O., Tien H., Wescott W.C. Methods for the formation of single bimolecular lipid membranes in aqueous solution. Journal of Physical Chemistry, v. 67, № 2, p. 534–535, 1963.
8. Sanjay K., Thejasenuo J. K. and Tsipila T. Toxicological effects of sodium dodecyl sulfate. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, v.6(5), p.1488-1492, 2014.
9. Tan A., Ziegler A., Steinbauer B., Seelig J. Thermodynamics of Sodium Dodecyl Sulfate Partitioning into Lipid Membrane. Biophysical J., v. 83, p. 1547–1556, 2002.
10. Tonoyan L. A., Torosyan A. L., Arakelyan V. B. Influence of sodium dodecyl sulfate on stability of bilayer lipid membranes. Proceedings of the Yerevan state university, Physical and Mathematical Sciences, № 1, p. 58–63, 2016.

Биол. журн. Армении, 1 (69), 2017

ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЛИСТЬЕВ ДЕРЕВЬЕВ В ЗЕЛЕННЫХ ЗОНАХ ГОРОДА ЕРЕВАН

Л.Р. ХАЧАТРЯН, Г.С. НЕРСИСЯН, М.А. НАВАСАРДЯН, Т.А. САРГСЯН,
Б.Х. МЕЖУНЦ, А.А. ОГАНЕСЯН

Центр эколого – ноосферных исследований НАН РА
lilit.khachatryan@cens.am

Изучалась сезонная динамика содержания общего азота, белков и фотосинтетических пигментов в листьях двух видов деревьев: ясеня обыкновенного (*Fraxinus excelsior* L.) и платана восточного (*Platanus orientalis* L.), широко распространенных в зеленых насаждениях города Еревана. Обнаружено, что к концу вегетации в листьях изученных двух видов уменьшились содержания общего азота, белков и хлорофиллов, в то время как изменения концентраций каротиноидов носили незакономерный характер. Выявлено, что содержание исследуемых показателей в растениях зависит от фазы вегетации, состояния и экологической устойчивости видов к условиям места произрастания.

Երևանի կանաչ տնկարկներում ամենատարածված երկու ծառատեսակների՝ Զացենի սովորականի (*Fraxinus excelsior* L.) և Սոսի արևելյանի (*Platanus orientalis* L.) տերևներում ուսումնասիրվել է ընդհանուր ազոտի, սպիտակուցների և ֆոտոսինթետիկ պիգմենտների պարունակության սեզոնային դինամիկան: Հայտնաբերվել է, որ հետազոտված ծառատեսակների տերևներում վեգետացիայի վերջում նվազել է ընդհանուր ազոտի, սպիտակուցների և քլորոֆիլների պարունակությունը, միևնույն կարողունակության պարունակությունները եկթարկվել են անօրինաչափ փոփոխության: Բացահայտվել է, որ բույսերում հետազոտված ցուցանիշների պարունակությունը կախված է վեգետացիոն փուլից, ծառատեսակների վիճակից և շրջակա միջավայրի նկատմամբ դրանց դրսևորած էկոլոգիական կայունությունից:

Քլորոֆիլ-կարոտինոիդներ-ազոտ-վեգետացիա-ծառ-տեսակ

The present article considers the seasonal dynamics of contents of total nitrogen, proteins and photosynthetic pigments in leaves of two tree species: European ash-tree (*Fraxinus excelsior* L.) and Eastern plane (*Platanus orientalis* L.) widely used in Yerevan greening. The study has found out that by the end of vegetation the contents of total nitrogen, proteins and chlorophylls decrease in the studied leaves, changes in carotinoids concentrations having an irregular character. The obtained results have indicated that the contents of studied indices depend on vegetation phase, condition and ecological tolerance of species to habitat conditions.

Chlorophyll-carotinoids-nitrogen-vegetation-trees-species

Проблема устойчивости растительных организмов к неблагоприятным факторам городской среды остается актуальной на протяжении многих лет. Установлено, что устойчивость растений к неблагоприятным абиотическим и биотическим факторам обеспечивается функционированием большого числа разнообразных механизмов, действующих на разных уровнях организации. Повышенная устойчивость растений к городским условиям определяется способностью к перестройке физиологических и биохимических процессов, проявлением приспособлений, развившихся ранее для защиты от других экстремальных факторов природной среды [14, 20].

Приспособление растений к экстремальным условиям наразличных уровнях биологической организации осуществляется по-разному. Для устойчивых видов характерна более высокая скорость прохождения всех обменных реакций, транслокации органических соединений. У устойчивых видов, по сравнению с неустойчивыми, отмечено меньшее угнетение фотосинтеза, дыхания, разрушение пластидных пигментов и других физиолого-биохимических процессов [12, 13, 9].

Среди физиологических процессов, определяющих рост растений и формирование их продуктивности, наиболее важным является фотосинтез. Поддержание фотосинтетической активности на высоком уровне способствует росту и развитию растений в неблагоприятных условиях среды и может служить показателем их устойчивости [18, 13, 14]. Способность растений поддерживать и сохранять относительно высокую интенсивность фотосинтеза в неблагоприятных условиях внешней среды имеет важное приспособительное значение, поскольку позволяет удовлетворить потребности в энергетических и пластических ресурсах, необходимых не только для роста и развития, но и для процесса адаптации. При этом, чем сильнее выражена эта способность у растений, тем выше их устойчивость к данному стресс-фактору [3, 4].

Известно, что в ходе фотосинтеза осуществляется поглощение и трансформация энергии солнечных лучей, в котором непосредственное участие принимают фотосинтетические пигменты листьев, и особенно, хлорофиллы и каротиноиды. Хлорофиллы характеризуются сложной химической структурой, основным компонентом которых является порфирин, содержащий атомы азота и марганца [2, 14]. Специфическое строение молекулы хлорофилла позволяет переходить в возбужденное состояние при незначительном количестве энергии (1 квант), благодаря которой осуществляются фотохимические реакции фотосинтеза. Каротиноиды также пог-

лощают солнечную энергию и передают ее хлорофиллу *a* [17, 16], т.е. они действуют в качестве дополнительных «светосборщиков» [19, 7]. Каротиноиды являются также одним из основных антиоксидантных соединений в клетке и участвуют в синтезе абсцизовой кислоты – «гормона стресса», благодаря которым обеспечивается устойчивость растений к различным стрессовым воздействиям. В этой связи уровень содержания каротиноидов в листьях можно рассматривать как важный индикатор устойчивости фотосинтетического аппарата растений.

Азотный обмен непосредственно связан с процессом фотосинтеза растений: азот и азотистые соединения необходимы для построения фотосинтетического аппарата. Синтез хлорофилла резко ослабляется при недостатке азота в питательной среде. Максимальное содержание хлорофилла в листьях совпадает с периодом образования половых клеток, т.е. началом цветения, после чего наблюдается снижение. Характерным признаком азотного голодания является торможение роста вегетативных органов растений и появление бледно-зеленой или даже желто-зеленой окраски листьев из-за нарушения образования хлорофилла [11].

Ранее нами изучались особенности азотного обмена в листьях деревьев, произрастающих в условиях города Еревана. Выявлено, что накопление азота в растениях зависит от видовых особенностей, фазы вегетации, степени загрязненности территории произрастания [8, 10].

Целью данной работы было выявить характер сезонных изменений содержания азота и фотосинтетических пигментов в листьях двух видов деревьев, произрастающих в различных частях города Еревана. Для достижения этой цели в двух фазах вегетации деревьев проводилась оценка их состояния и определение содержания общего азота, белков, хлорофиллов и каротиноидов листьев.

Материал и методика

Объектами исследований были наиболее распространенные в городе 2 вида деревьев: ясень обыкновенный - *Fraxinus excelsior* L. и платан восточный - *Platanus orientalis* L.. Исследования состояния деревьев и отбор проб листьев проводили в начале (июнь) и конце (сентябрь) активной вегетации растений в течение 2016 года в 9-ти пилотных точках зеленых зон г. Еревана. Оценка состояния растений проводилась исходя из видимых признаков угнетенности растений: деформации вегетативных органов, степени поражения ассимиляционного аппарата, дехромации и дефолиации, разреженности кроны, количеству сухих ветвей и т.д. [1].

Содержание общего и белкового азота определяли в воздушно-сухом растительном материале по экспресс методике с помощью реактива Несслера [5].

Содержание фотосинтетических пигментов (хлорофиллы *a* и *b*, каротиноиды) определяли по модифицированной методике, основанной на использовании органического растворителя диметилсульфоксида $[(CH_3)_2SO]$, который позволяет получать устойчивые экстракты, необходимые для выполнения внелабораторных исследований [6]. Измерение проводилось на спектрофотометре (СФ-16), а количественный учет хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов – по формулам Маккини-Арнона и Веттштейна [15].

Пилотные участки в г. Ереване: 1. Сквер им. Абовяна; 2. Кольцевой парк (ул. Ханджяна); 3. Парк около озера в Эребуни; 4. Парк им. Комитаса (пр. Аршакуняц); 5. Сквер на ул. Арин-берд (около НПО Наирит); 6. Сквер на ул. Раффи (Юго-западный массив); 7. Сквер на ул. Т. Петросяна (Давиташен); 8. Парк Арабкир (пр. Комитаса); 9. Парк на пр. Гая (Нор Норк).

Результаты и обсуждение

К основным видимым изменениям у растений, произрастающих на городских территориях, можно отнести: количественные изменения их морфо-физиологических признаков, появление различных деформаций органов, общее снижение продуктивности, изменение окраски листьев в результате хлороза, некроза и других причин, раннее пожелтение и опадение листьев, замедление или ускорение развития. При этом наиболее заметно эти изменения проявляются у чувствительных к загрязнению видов растений, тогда как у устойчивых видов видимых признаков может и не наблюдаться [1, 12, 8].

Наши фенологические исследования показали, что в июне только в одной из исследуемых точек города - Сквер около НПО Наирит (ул. Арин-Берд), деревья платана оценивались как сильно ослабленные: наблюдались изменение окраски листьев в результате хлороза и некроза, пожелтение листьев, наличие сухих веток. В конце сентября во всех изученных точках состояние деревьев этого вида заметно ухудшилось, видны были признаки раннего окончания вегетационного периода: пожелтение и опадение листьев, замедление роста, сильное разрежение кроны, ранний листопад, увеличение количества сухих ветвей.

Иная картина наблюдалась в случае ясеня: как в начале, так и в конце вегетации деревья этого вида находились в хорошем состоянии во всех исследуемых точках, за исключением двух: в центре (парк им Комитаса, ул. Аршакуняц) и северо-восточной (Нор Норк, пр. Гая) частей города, где в июне некоторые деревья были ослаблены и поражены вредителями. Надо отметить, что некрозы, уменьшение прироста, усыхание ветвей и т.д. являются следствием нарушения комплекса физиологических процессов. Исходя из проведенной нами оценки состояния можно было прийти к предварительному выводу о том, что из двух исследуемых видов ясеня обыкновенный является наиболее устойчивым видом к факторам среды города.

Показателем активности синтетических процессов служит содержание белков и азота в листьях, поскольку последний является одним из необходимых макроэлементов для жизни растений: входит в состав всех белков (содержание его колеблется от 15 до 19%) нуклеиновых кислот, аминокислот, хлорофилла, ферментов, многих витаминов, липоидов и других органических соединений, образующихся в растениях. Общее содержание азота в растении составляет 0,2-5 % и более массы воздушно-сухого вещества [11].

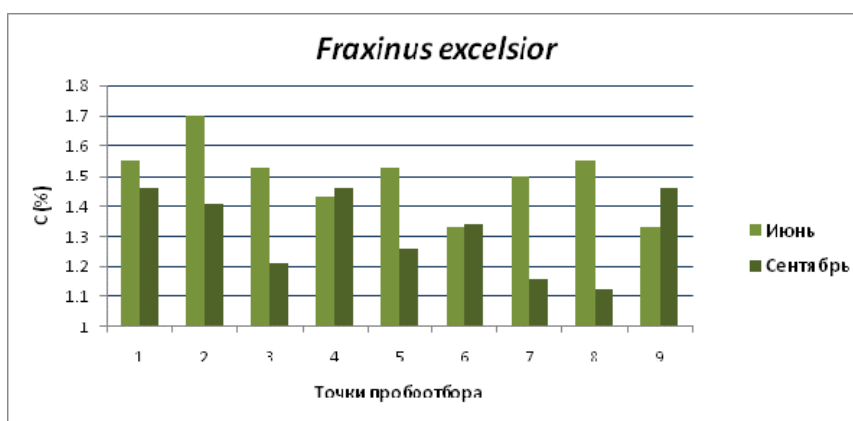


Рис. 1. Сезонная динамика концентраций азота в листьях ясеня.

Исследование сезонной динамики азота в листьях исследуемых деревьев выявило четкую тенденцию к снижению содержания элемента к концу вегетации, что вполне закономерно. Средние концентрации азота в листьях ясеня уменьшились на 12%, а платана - на 14 %. Только в южной, промышленной зоне города (точка 5) в листьях платана и в двух случаях (точки 4 и 9) в листьях ясеня в центре и северо-восточной частях города содержание азота было выше в сентябре. Максимальные концентрации азота в июне в листьях платана составляли 1.7-1.8%, а ясеня - 1.56-1.7% на сухое вещество. Они были обнаружены в растениях Кольцевого парка (т. 2), скверов на улице Раффи (т. 6) и в Давиташене (т. 7) (рис.1,2).

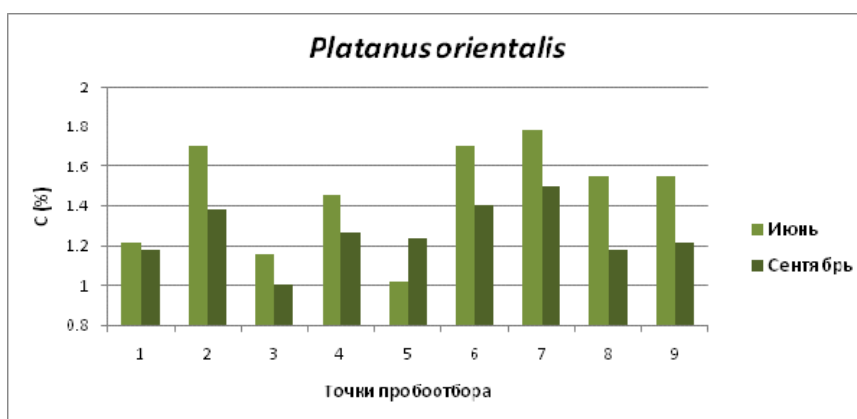


Рис. 2. Сезонная динамика концентраций азота в листьях платана.

Наиболее активный синтез белка обнаружен в листьях обеих изученных видов в июне. Значения среднего содержания суммарного белка в листьях ясеня были в пределах 8.3-9.7, а платана – 7.1-10.2% от веса воздушно-сухой массы. В конце вегетации суммарное содержание белков также снижалось, за исключением тех же вариантов, как и в случае с общим азотом.

По всей видимости, такие изменения в азотном обмене связаны с рядом факторов, в том числе и неблагоприятными экологическими условиями среды, которые воздействуют на состояние и метаболизм растений. Как было отмечено выше, фенологические исследования показали, что в указанных точках растения были поражены вредителями и ослаблены, а на листьях были обнаружены пятна хлороза. Исследование концентраций токсикантов в растениях изученных участков города позволит более детально выявить экологические факторы, влияющие на состояние и жизнедеятельность растений.

Сезонные изменения суммарного содержания хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов в листьях ясеня и платана, произрастающих в 9 точках пробоотбора, представлены на рисунках 3 и 4. Как видно (рис. 4), содержание хлорофиллов в листьях ясеня в июне колебалось в пределах 214-368 мг/100г сырого образца (в среднем 269), при этом высокие показатели обнаружены в точках 1, 2 и 4, а низкие – 3, 5 и 9.

В этот период концентрация хлорофиллов в листьях платана варьировала 212-398 мг/100г сырого образца (в среднем 271), минимальный показатель которой также был обнаружен в точке 3, т.е. южной части города (Эребуни), хотя деревья в данной точке находились в удовлетворительном состоянии. В сентябре у исследуемых деревьев происходило снижение хлорофиллов и по точкам пробоотбора достигло у ясеня 153-272 (в среднем 197) и платана 169-253 мг/100г сырого образца (в среднем 210), т.е. среднее содержание хлорофиллов по всем пунктам и срокам измерений у

обоих деревьев было одинаковым. Из рисунка 3 видно, что в листьях ясеня в сентябре снижение содержания хлорофиллов по пунктам происходило равномерно (21-33%), тогда как у платана оно варьировало в больших пределах (4-44%), более того, в 9-ом пункте изменений вовсе не наблюдалось.

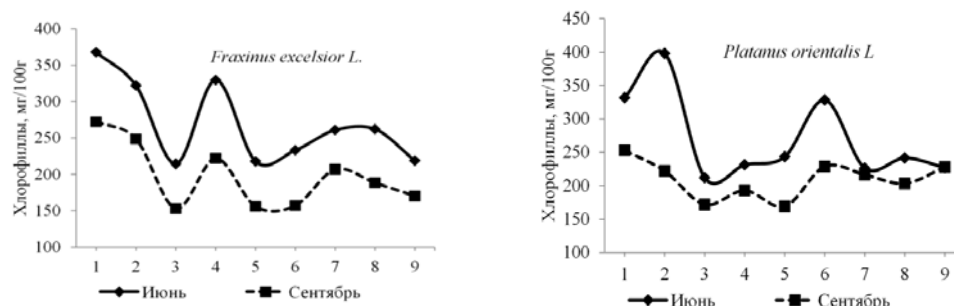


Рис. 3. Сезонные изменения содержания хлорофиллов в листьях ясеня и платана по точкам пробоотбора

Содержание каротиноидов в листьях исследуемых деревьев существенно менялось как по фазам, так и точкам пробоотбора (рис. 4): в июне оно в листьях ясеня варьировало в пределах 109-172, а в сентябре – 83-132 мг/100г сырого образца, тот же показатель платана в двух сроках, соответственно, составил 83-149 и 70-146 мг/100г сырого образца. Первая диаграмма рисунка 4 показывает, что у ясеня содержание каротиноидов в сентябре, по сравнению с июнем, в 7 точках уменьшилось (от 4 до 24%), в одной вовсе не менялось (т. 7), а в точке 3, наоборот, увеличилось на 11%. У платана наблюдалась несколько иная картина: в 4-х точках каротиноиды увеличились на 22-77%, в одной (т. 8) происходило заметное снижение (36%), а в остальных – их содержание почти не менялось.

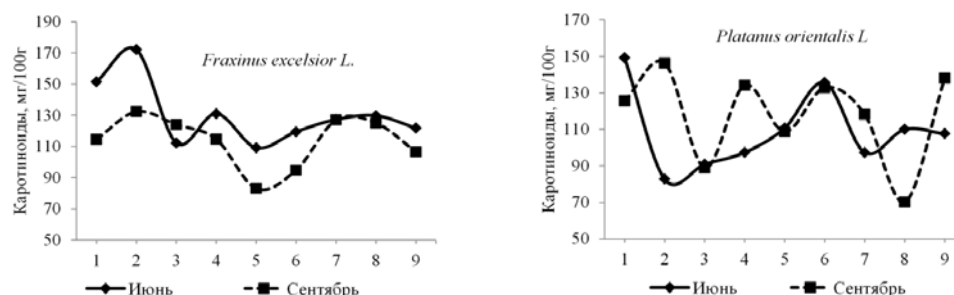


Рис. 4. Сезонные изменения содержания каротиноидов в листьях ясеня и платана по точкам пробоотбора

Закключение. Таким образом, исследование сезонной динамики азота в листьях обеих исследуемых деревьев выявило тенденцию к снижению содержания элемента и суммарного содержания белков к концу вегетации. Исключение составляли значения азота в листьях растений в южной, центральной и северо-восточной частях города, где растения были поражены вредителями и ослаблены, а на листьях были обнаружены пятна хлороза. По всей видимости, такие изменения в азотном обмене

связаны с рядом факторов, в том числе и неблагоприятными экологическими условиями среды, которые воздействуют на состояние и метаболизм растений.

Установлено, что содержание хлорофиллов в листьях деревьев ясеня и платана в конце вегетационного периода (сентябрь) заметно снизилось. Изменения в содержании хлорофиллов наблюдались по разным местам произрастания деревьев, хотя статистическая обработка данных, полученных по 9-ти пунктам пробоотбора, установила, что исследуемые виды в июне и сентябре существенно не различались по среднему содержанию хлорофиллов. Содержание каротиноидов заметно менялось по пунктам и фазам вегетации растений, однако эти колебания, особенно у платана, носили незакономерный характер. Обобщая полученные данные можно сказать, что в конце вегетации исследуемых деревьев происходит более заметное снижение содержания хлорофиллов, чем каротиноидов, что очевидно связано с повышением роли желтых пигментов в фотосинтетических реакциях растений в данный период.

Результаты нашего исследования свидетельствуют о том, что содержание исследуемых физиолого-биохимических показателей в растениях зависит от фазы вегетации, состояния и экологической устойчивости видов к условиям места произрастания. Дальнейшее исследование концентраций токсикантов в растениях изученных участков города позволит более детально выявить экологические факторы, влияющие на состояние и жизнедеятельность растений.

Литература

1. Алексеев В.А. Некоторые вопросы диагностики и классификации повреждённых загрязнителями экосистем. Лесные экосистемы и атмосферное загрязнение. Лн.: Наука, с. 38–54, 1990.
2. Гюббенет Е.Р. Растение и хлорофилл. М.-Л., изд-во АН СССР, 247 с., 1951.
3. Кулагин А.А., Юсупов А.А. О содержании фотосинтетических пигментов в хвое лиственницы Сукачева (*Larix sukaczewii* Dyl.) при развитии в условиях аэротехногенного полиметаллического загрязнения окружающей среды. Изв. Самарского НЦ РАН. Т. 10, № 2, с. 617–620, 2008.
4. Лысенко В.С., Вардун Т.В., Соьер В.Г., Краснов В.П. Флуоресценция хлорофилла растений как показатель экологического стресса: теоретические основы применения метода. Фундаментальные Исследования. № 4, с. 112–120, 2013.
5. Маргарян А.А., Оганесян А.А. Экспресс-микрометод колориметрического определения фракций азота в растениях. Информационный листок, Ереван, АрмНИИНТИ, № 28, 4 с., 1979.
6. Межуниц Б.Х., Навасардян М.А. Метод определения содержания хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов в экстрактах листьев растений. Патент на Изобретение, № 2439А, Ереван, 2010.
7. Мокроносов А.Т., Гавриленко В.Ф., Жигалова Т.В. Фотосинтез. Физиолого-экологические и биохимические аспекты. М.: Академия, 446 с., 2006.
8. Нерсисян Г.С., Оганесян А.А. Особенности метаболизма растений в условиях г. Еревана. Известия аграрной науки, Тбилиси, Грузия, ISSN 1512-1887, Т.10, № 1, с.107-112, 2012.
9. Николаевский В.С. Влияние техногенных выбросов на древесные растения. М, 260 с., 2003.
10. Оганесян А.А., Нерсисян Г.С. Изучение особенностей азотного обмена растений в условиях города Еревана. Биологический журнал Армении, Т. LXII, 1(62), с. 57-61, 2010.
11. Пейве В.Я. Микроэлементы – регуляторы жизнедеятельности и продуктивности растений. Под ред. акад. Я.В. Пейве, Рига 248 с., 1971.
12. Сергейчик С.А. Растения и экология. М.: 220 с., 1997.
13. Тарабрин В.П. Физиология устойчивости древесных растений в условиях загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами. Микроэлементы в окружающей среде, Киев: Наук. думка, с. 17–19, 1980.

14. Харборн Дж. Введение в экологическую биохимию. М., Мир, 312 с., 1985.
15. Шлык А.А. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев. Биологические методы в физиологии растений. М.: Наука, с. 154–170, 1971.
16. Cohen-Bazire G., Stanier R.Y. Specific inhibition of carotenoid synthesis in a photosynthetic bacterium and its physiological consequences. Nature, 181, p. 250-252, 1958.
17. Griffiths M., Sistrom W.R., Cohen-Bazire G., Stanier R.Y., Calvin M. Function of carotenoids in photosynthesis. Nature, 176, p. 1211-1215, 1955.
18. Krupa Z., Baszyński T. Some aspects of heavy metals toxicity towards photosynthetic apparatus – direct and indirect effects on light and dark reactions. Acta Physiol. Plant, V. 17, p. 177–190, 1995.
19. Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and carotenoids – pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in enzymology. V. 148, p. 350–382, 1987.
20. Manning W.J., Feder W.A. Biomonitoring Air Pollutants with plants. Appl. Sci. Publ. LTD, London, 140 p., 1980.

Биолог. журн. Армении, 1 (69), 2017

УДК 616.9-02/-092

АНТИБИОТОКУЧУВСТВЕЛЬНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

А.В.ЦАКАНЯН⁽¹⁾, Ю.Т.АЛЕКСАНИЯН⁽¹⁾, Г.Г.МЕЛИК-АНДРЕАСЯН⁽¹⁾,
Г.Ж.ХАНДЖЯН⁽¹⁾, Н.А.АНДРЕАСЯН⁽²⁾, А.Б.АЗАТЯН⁽²⁾.

*НИИ Эпидемиологии, вирусологии и медицинской паразитологии им. А.Б.Алексаняна МЗ РА⁽¹⁾
Национальное бюро экспертиз НАН РА⁽²⁾*

В настоящее время большое внимание уделяется вопросам санитарно-микробиологического качества пищевых продуктов, что прежде всего обусловлено значительным ростом заболеваний во многих странах, связанных с употреблением пищевых продуктов, контаминированных различными микроорганизмами, что не только снижает их пищевую и биологическую ценность, делая невозможным использование в питании, но и является довольно серьезной проблемой с точки зрения заражения людей. Кроме изменений органолептических свойств продукта, микроорганизмы приводят к накоплению токсических веществ, которые могут привести к пищевым токсикозам.

чувствительность, антибиотики, молочные продукты.

Հետազոտվել է 58 մանրէների զգայունությունը լալնորեն օգտագործվող հակաբիոտիկների նկատմամբ, որոնցից 75.9% պատկանում էին *Escherichia coli*-ին, 13.8% *Staphylococcus epidermidis*-ին, 5.2% *Staphylococcus aureus*-ին, 5.2% - *Pseudomonas aeruginosa*-ին: Հետազոտության արդյունքները ցույց են տվել, որ մանրէները բարձր զգայունություն են ցուցաբերել կարբենսիմոնների նկատմամբ՝ 100% խմիպենսինի, մերոպենսինի, 86.7% ցեֆեպիմի; ֆտորիսինոլոնների՝ 100% մոկսիֆլուկսացինի, 92.9% օֆլոկսացինի, 85.7% ցիպրոֆլուկսացինի, 83.3% նորֆլուկսացինի, նալիդիկսաթթվի 73.3%; ամինոգլիկոզիդների՝ 92.5% գենտամիցինի, 88.7% ամիկացինի; բետա-լակտամների՝ 94.4% կարբենիցիլինի, 89.5% ցեֆոպերազոնի, 50.0% ցեֆտազիդի; 80.0% լևոմիցետինի նկատմամբ: Հետազոտված մանրէները կայուն էին բետա-լակտամների՝ 100% ցեֆտրիակսոնի, 92.1% օկսացիլինի, 90.3% ցեֆուրոկսիմի, 81.25% ցեֆալոտինի, 73.1% աուգմենտինի, 68.97% ցեֆազոլինի, 50.0% ցեֆտազիդի նկատմամբ; ամինոգլիկոզիդների՝ 88.9% ազիտրոմիցինի, 84.2% ստրեպտոմիցինի, 75.0% կլարիտրոմիցինի նկատմամբ: Շտամների 98.3%-ը պոլիռեզիստենտ են և կայունություն են ցուցաբերել 2-14 հակաբիոտիկների նկատմամբ:

մանրէներ, հակաբիոտիկներ, զգայունություն, կայունություն

In the Republic of Armenia there has been investigated the sensitivity of 58 microorganisms (75.9% -44 strains of *Escherichia coli*, 13.8 %-8 strains of *Staphylococcus epidermidis*, 5.2%-3

strains of *Staphylococcus aureus* , 5.2%- 3 strains of *Pseudomonas aeruginosa*) towards widely used antibiotics. Investigation results revealed high sensitivity of bacteria towards meropenem, imipenem (100%), cefepime (86.7%), moxifloxacin (100%), ofloxacin (92.9%), ciprofloxacin (85.7%), norfloxacin (83.3%), nalidixic acid (73.3%), levomycetin (80.0%), gentamicin (92.5%), amikacin (88.7%); carbenicillin (94.4%), cefoperazone (89.5%), ceftazidime (50.0%), levomycetin (80.0%). Investigated bacteria were resistant towards beta-lactams: ceftriaxone (100%), oxacilline (92.1%), cefuroxime (90.3%) cephalotine (81.25%), augmentin (73.1%), cefazolin (68.9%), (50.0%) ceftazidime (50.0%), azithromycin (88.9%), streptomycin (84.2%), clarithromycin (75.0%). 98.3% (57 out of 58) of strains were poly-resistant towards 2-14 antibiotics.

microorganisms, sensitivity, antibiotics, dairy products.

Залогом крепкого здоровья и хорошего самочувствия в любом возрасте является соблюдение принципов правильного питания. Важно не только соблюдать режим, исключать из рациона вредную пищу, но и не забывать об употреблении полезных и разнообразных продуктов.

Пищевые продукты должны удовлетворять физиологическим потребностям человека в необходимых для организма веществах и энергии, отвечать не только предъявляемым к ним требованиям безопасности, установленным нормативными документами (с января 2016 года техническими регламентами Таможенного союза) по микробиологическим показателям и предельно допустимым концентрациям химических, радиоактивных, биологических веществ и их соединений, представляющих опасность для здоровья [8]. Кроме этого, для каждого типа продуктов существуют органолептические и физико-химические показатели соответствия нормам, установленным производителями (технические условия).

Кисломолочные продукты, являясь обязательным составляющим правильного здорового питания, благоприятно влияют на пищеварительную систему, повышают иммунитет, защищают организм от инфекций, насыщают организм витаминами и микроэлементами [9].

Известно, что постоянную микрофлору кишечника человека составляют генетически различные клоны популяций кишечной палочки, состав которых у разных людей различен. Для внедрения в популяцию нового штамма необходимо, чтобы он был представлен значительным числом клеток. Считается, что для этого необходимо по крайней мере 10^6 клеток, что возможно при использовании сильно обсемененных пищевых продуктов. В практике здравоохранения и животноводства в результате воздействия антибиотиков чувствительные микроорганизмы погибают, а резистентные сохраняются.

Приобретенная резистентность закрепляется и передается по наследству последующим поколениям бактерий. Примером являются эшерихии, которые служат постоянным резервуаром плазмид резистентности в организме человека. На современном этапе возникновение и циркуляция полирезистентных штаммов микроорганизмов представляет большую проблему, которая опасна в отношении возникновения вспышечной заболеваемости не только в Республике Армения, но и во многих развитых и развивающихся странах.

Цели и задачи исследования. Одними из широко потребляемых населением продуктов являются - молочные продукты. С целью выяснения роли молочных продуктов как источников антибиотикорезистентных микроорганизмов, изучена чувствительность последних к широко применяемым на практике здравоохранения антибиотикам.

Материалы и методы

Материалом для микробиологических исследований послужили поступившие на экспертизу пищевые продукты (творог, сметана, масло, сыр, детская молочная смесь). Бактериологическое исследование материала, выделение чистой культуры и идентификация микроорганизмов, производились в соответствии с методиками определения каждой группы микроорганизмов отдельно, согласно действующим в Республике Армения нормативным документам [1-3,7,8]. Для идентификации выделенных микроорганизмов производили бактериоскопию выросших колоний, предварительно окрасив мазки по методу Грама.

Антибиотикочувствительность исследованных штаммов микроорганизмов проверялась по отношению к широко применяемым на практике антибиотикам: фторхинолонам (ципрофлоксацину, моксифлоксацину, офлоксацину, норфлоксацину, налидиксовой кислоте); карбопенемам (меропенему, имипенему, цефепиму); бета-лактамам (оксациллину, аугментину, амоксициллину, карбенициллину, цефтазидину, цефтриаксону, цефалексину, цефазолину, цефалотину, цефуроксиму, цефоперазону, ампициллин-сульфбактаму); аминогликозидам (амикацину, гентамицину, ванкомицину, стрептомицину, клиндамицину, азитромицину); тетрациклинам (тетрациклину, доксициклину); препаратам нитрофуранового ряда (фурадонину, триметопримсульфаметоксазолу).

Чувствительность определялась диско-диффузионным методом на твердой питательной среде посевом суточных бульонных культур микроорганизмов. Результаты оценивались по диаметру зоны задержки роста микроорганизмов к антибактериальным препаратам [5].

Чувствительность к 0,1% раствору хлорамина осуществлялась методом обеззараживания батистовых тест-объектов, обсемененных суспензией указанных микроорганизмов, содержащей в 1 мл 2 млрд. микробных клеток, в экспозициях 5, 10, 15, 20, 25, 30 минут [5].

Результаты

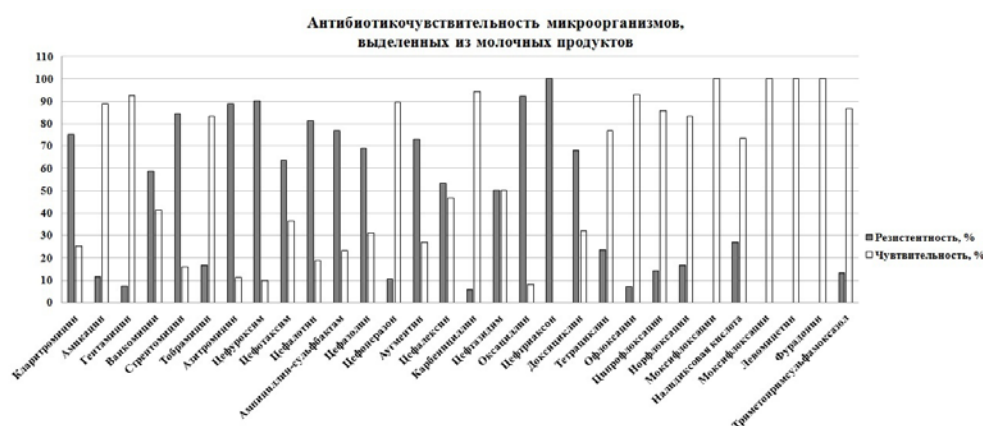
При бактериологическом исследовании различных пищевых продуктов выделены и изучена антибиотикочувствительность 58 штаммов микроорганизмов, из которых 75.9% (44 штамма) принадлежали к *Escherichia coli*, 13.8% (8 штаммов) - *Staphylococcus epidermidis*, 5.2% (3-штамма) - *Staphylococcus aureus*, 5.2% (3-штамма) - *Pseudomonas aeruginosa*.

Из 44 штаммов *Escherichia coli* 45.5% (20 штаммов) выделены из творога, 27.3% (12 штаммов) - сметаны, 15.9% (7 штаммов) - масла, 11.4% (5 штаммов) - сыра. Из 8-ми штаммов *Staphylococcus epidermidis* 5 выделены из творога, 2 - сыра, 1 - сметаны. 3 штамма *Staphylococcus aureus* выделены из детской молочной смеси, творога и сыра. 3 штамма *Pseudomonas aeruginosa* выделены: два - из масла, один - из сыра. При экспертизе пищевых продуктов присутствие колиформ (в частности *Escherichia coli*) в основном было отмечено в массе продукта значительно малой, чем масса продукта, в которой по ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» и ТР ТС 033/2013 «О безопасности молока и молочной продукции» их присутствие не разрешается [3,7]. Известно, что чем меньше титр кишечной палочки, тем выше загрязненность пищевого продукта, тем хуже санитарно-гигиеническое состояние и тем больше оснований опасаться, что на нем могут быть и болезнетворные микроорганизмы.

Изучение антибиотикочувствительности 58 штаммов микроорганизмов, выделенных из молочных продуктов показало, что они чувствительны к аминогликозидам: 92.5, 88.7, 83.3% к гентамицину, амикацину, тобрамицину, соответственно; фторхинолонам: 100, 92.9, 85.7, 83.3, 73.3% к моксифлоксацину, офлоксацину, цип-

рофлоксацину, норфлоксацину, налидиксовой кислоте, соответственно; бета-лактамов: 94.4, 89.5% к карбенициллину, цефоперазону, соответственно; карбопенемов: 100% имипенему, меропенему, 86.7% цефепиму; хлорамфениколу - 80.0% левомицетину; 76.7% тетрациклину; к препаратам нитрофуранового ряда: фурадонину, триметопримсульфаметоксазолу 78.9%, 52.4%, соответственно.

Выделенные микроорганизмы резистентны к аминогликозидам: 88.9, 84.2, 75.0, 58.8% к азитромицину, стрептомицину, кларитромицину, ванкомицину, соответственно; бета-лактамам: 100, 92.1, 90.3, 81.25, 76.9, 73.1, 68.97, 63.6, 53.3, 50.0% к цефтриаксону, оксациллину, цефуроксиму, цефалотину, ампициллин-сульфбактаму, аугментину, цефазолину, цефотаксиму, цефалексину, цефтазидиму, соответственно; 67.9% к доксициклину.



Основная часть выделенных и изученных микроорганизмов - 75.9% относились к *Escherichia coli*. Подобная картина чувствительности/резистентности наблюдается и у штаммов *Escherichia coli*.

Изучение антибиотикочувствительности выделенных штаммов микроорганизмов показало, что 98.3% (57 из 58 штаммов) были полирезистентными. Анализ полирезистентности этих штаммов показал, что они проявили одновременную устойчивость к действию от 2 до 14 антибиотиков, причем к 2 антибиотикам были полирезистентны 6.9% (4 штамма), к 3-м - 10.3% (6 штаммов), к 4-м - 3.4% (2 штамма), 5-ти - 17.2% (10 штаммов), к 6-ти - 18.9% (11 штаммов), к 7-ми - 25.9% (15 штаммов), к 8-ми - 10.3% (6 штаммов), к 9-ти, 11-ти, 14-ти - 1.7% (по 1 штамму).

Маркерами резистентности этих штаммов являлись - цефтриаксон, оксациллин, цефуроксим, азитромицин, стрептомицин, цефалотин, ампициллин-сульфбактам, кларитромицин, аугментин, цефазолин, доксициклин, цефотаксим, ванкомицин, цефалексин. Подобная картина резистентности/чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам наблюдается и у штаммов микроорганизмов, выделенных у людей в Республике Армения [9].

Одновременно вместе с антибиотикочувствительностью была изучена и чувствительность к 0,1% раствору хлорамина 19 штаммов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов (*Escherichia coli* - 14 штаммов, *Staphylococcus epidermidis* - 3 штамма, *Staphylococcus aureus* - 2 штамма), выделенных из творога (16 штаммов), сметаны (2 штамма), сыра (1 штамм). Из этих штаммов микроорганизмов - 84,2% (14 штаммов) были чувствительны, 10.2% (2 штамма - по одному штамму *Escherichia coli*

и *Staphylococcus epidermidis*) обладали средней устойчивостью, 5.3% (1 штамм *Escherichia coli*) устойчивостью к 0.1% раствору хлорамина. Все три последние штаммы выделены из творога.

Таким образом, широкая циркуляция полирезистентных к антибиотикам и обладающих средней устойчивостью и устойчивостью к дезинфектантам (в частности к 0.1% раствору хлорамина) микроорганизмов может привести к осложнению эпидемической ситуации в республике. Осуществление целенаправленного бактериологического контроля пищевых продуктов и перерабатывающих их предприятий является необходимым звеном в снижении количества экзогенно поступающих в организм резистентных штаммов микроорганизмов и является частью программы «Глобальной стратегии ВОЗ по сдерживанию устойчивости к противомикробным препаратам» [4]. Меры по ограничению распространения лекарственно-устойчивых микроорганизмов должны быть направлены как на предупреждение формирования резистентных популяций, так и на подавление уже сформировавшихся популяций.

Литература

1. ГОСТ 30347- 97 Молоко и молочные продукты. Методы определения *Staphylococcus aureus*.
2. ГОСТ 9225-84 Молоко и молочные продукты. Методы микробиологического анализа
3. ГОСТ 30518-97 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий семейства *Enterobacteriaceae*.
4. Глобальная стратегия ВОЗ по сдерживанию устойчивости к противомикробным препаратам. WHO CDS CSR DRS 2001/2a
5. «Инструкция по определению бактерицидных свойств новых дезинфицирующих средств». М., No 739-68, 12с.
6. Методические указания МУК 4.2.1890-04 "Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам". (Утв. Главным сан. врачом РФ 4 марта 2004г.
7. ТР ТС 033/2013 «О безопасности молока и молочной продукции».
8. ТЕХНИЧЕСКИЙ РЕГЛАМЕНТ ТАМОЖЕННОГО СОЮЗА (ТР ТС 021/2011) «О безопасности пищевой продукции».
9. Цаканян А.В., Алексанян Ю.Т., Гукасян Г.Б. и др.. Антибиотикорезистентность и чувствительность микроорганизмов, выделенных у больных в РА. Вестник МАНЭБ, 2010, т. 15, №2, стр.87-91.
10. Kislomolochnye-produkty-poleznye-svoystva-i-protivopokazaniya.

Биолог. журн. Армении, 1 (69), 2017

КВАНТОВЫЙ ПЕРЕХОД КАК МЕХАНИЗМ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА IN VIVO

Э. А. ТУМАСЯН

Гос. Университет Санкт-Петербурга, Кафедра генетики и селекции
tumasyan.emma@gmail.com

Доза, являясь результатом взаимодействия двух параметров энергии (обусловленной агентами) и времени ($D=E \cdot T$), как инструмент, обеспечивает получение результатов, анализ которых методом диалектики “причина и следствие” выявляет ряд закономерностей: дискретность, непрерывность, гомогенность, гетерогенность, относительность, чередование, скачкообразность, спонтанность и корреляционная взаимосвязь между генотипом и фенотипом у организмов in vivo, которые являются достаточными и необходимыми факторами, чтобы утверждать «квантовую теорию» механизма биологического процесса.

Анализ моделированных результатов по методу “причина и следствие” – ряд закономерностей – квантовая теория как механизм биологического процесса

Դոզան հանդիսանալով երկու պարամետրների էներգիայի (պայմանավորված ագենտներով), և ժամանակի փոխազդեցության արդյունք ($D=\Theta \cdot T$), որպես ուսումնասիրության գործիք, ի հայտ է բերել կենսաբանական պրոցեսների մի շարք բնութագրող օրինաչափություններ. ընդհատություն, անընդհատություն, համասեռություն, ոչհամասեռություն, հարաբերականություն, հաջորդականություն, թռիչքածնություն, սպոնտանություն, և կոռռելացիոն ուղղակի կապ գենոտիպի և ֆենոտիպի միջև կենսաբանական պրոցեսներում *in vivo*, որոնք բավարար և անհրաժեշտ պայման են հաստատելու կենսաբանական պրոցեսների մեխանիզմի «բվանտային տեսությունը» ըստ Շրեդինգերի (15).

Մոդելավորված արդյունքների անալիզ – «պատճառ և հետևանք» օրենքով – մի շարք օրինաչափություններ – բվանտային տեսություն, որպես կենսաբանական պրոցեսների մեխանիզմ

Dosage, being result of interaction of two parameters – Energy (conditioned by agents) and Time (D (dosage) = E (energy) $\times$ T (time)), as instrument brings about results, analysis of which according to the method of dialectics “cause and consequence” reveal a number of patterns: discreteness, continuity, homogeneity, heterogeneity, relativity, discontinuity, abruptness, spontaneity and correlation between genotype and phenotype in the organism *in vivo*, that characterize sufficient and necessary factor to approve the “quantum theory” of Шредингер, (15) that the mechanism of the biological process *in vivo*.

Analysis of modeled results according to the “cause and consequence” -- a number of patterns – quantum theory as a mechanism of biological process

Большое количество результатов, полученных многими исследователями и нами, дали возможность моделировать эти результаты, чтобы проводить анализ согласно методу диалектики «причина $\leftrightarrow$ следствие».

Разнообразие многочисленных агентов – как инструмент изучения биологических процессов *in vivo*, подвергались анализу. В результате получилось, что эти агенты разной природы (физические, химические, биологические и т.д.) обладают единым, общим вектором действия – энергией (Θ), как параметр, взаимодействуя с параметром времени (T), определяет понятие дозы ($D=\Theta T$) и эта доза вызывает биологический процесс *in vivo* при двух формах обработки 1) $\Theta = \text{cost } f(t)$ и 2) $T = \text{cost } f(\Theta)$.

Изучая биологический процесс полной кинетикой (min-max-min) *in vivo* методом «доза-эффект» выявили закономерности: дискретность, непрерывность, гомогенность, гетерогенность, относительность, чередование, скачкообразность и спонтанность, характеризующие биологические процессы *in vivo* и дозу, вызывающую этот процесс *in vivo* у организма. Кроме того, эти закономерности обеспечивают взаимосвязь между процессами, происходящими в организме и между организмами *in vivo*, корреляционную взаимосвязь между процессами генотипа и фенотипа, происходящими в организме и процессами морфологических изменений у этого же организма *in vivo*. Явление корреляции и эти закономерности, характеризующие дозу и биологические процессы, являются достаточным и необходимым фактором, чтобы утверждать «квантовую теорию» Шредингера, (15), что механизм биологического процесса *in vivo* имеет физическую природу, который осуществляется переходом кванта в биологическом материале.

Веками и до наших дней проводили и проводят исследования биологических процессов (мутации, морфологические изменения, физиологические и т.д.) у разных организмов, начиная с микроорганизмов, кончая высшими *in vivo*, используя как инструмент изучения агентов разной природы (физические, химические, биологические и т.д.) с дозовой зависимостью (2, 4, 8, 23). Однако, в основном, анализ результатов, полученных в этих работах, является неполноценными недостоверным из-за отсутствия изучения биологического процесса в целом (полной кинетикой min-max-min значениями частот) не соответственно законам диалектики.

Следовательно, выводы, сделанные анализом этих результатов, являются неполноценными и недостоверными (6,11,24). И поэтому, увеличение числа таких работ год за годом приводит к возрастанию многочисленных проблем в биологии, в медицине, в сельском хозяйстве и т.д. (4). Известно, что решение этих проблем в основном обусловлено выявлением сущности механизма биологического процесса (Inge-Vechtomov, 2005), и поэтому, надо обратить внимание на другой механизм, так, например, «квантовая теория», которая была выдвинута Э. Шредингером в 1947 году, в чем не сомневались и другие исследователи (10,11,13,24).

Решение этих проблем в основном связано с использованием методологических аспектов согласно законам диалектики, которыми являются моделирование результатов и анализ этих результатов методом «причина и следствие» (5,14).

Имея ввиду это, проводим изменения, при которых условиями являлись следующими:

1. Методом изучения выбрали «доза-эффект»;
2. Как инструмент изучения использовали агенты разной природы (физические, химические и т.д.);
3. Тест-объектом изучения служил, в основном, микроорганизм, у которого можно было изучать как биологические процессы (мутационные), происходящие внутри организма, так и процессы морфологических изменений клеток, в норме имеющих гомогенную форму по морфологии (фото 1);
4. Вызывать процесс полной кинетикой, т.е. процесс min-max-min значениями частот (рис. 1);
5. Использовать у организма *in vivo* метод моделирования результатов, полученных нами и другими исследователями, чтобы анализировать их согласно методу «причина↔следствие».

I. До начала экспериментальной работы обратим внимание на действие разнообразных агентов (физический, химический), их концентрации, интенсивности облучения. Поскольку разные по природе агенты, их концентрации (C) и интенсивности облучения (I) вызывают тот же биологический процесс у организма *in vivo*, то они обладают единым вектором действия, которым может являться только энергия. Следовательно, она при излучении используется как общий вектор действия. ($\mathcal{E}_c$, $\mathcal{E}_I$).

II. Чтобы получить биологический процесс полной кинетикой (min-max-min) значениями частот, эксперименты проводили методом «доза-эффект» с двумя формами обработки (рис. 1).

Биологический процесс полной кинетикой (min-max-min) $F_{0min} - F_{2max} - F_{4min}$ значениями частот получили (рис. 1) действием определенной величины времени ($T=cost$) и интервала энергии [$\mathcal{E}_{c0} - \mathcal{E}_{c4}$] или [$\mathcal{E}_{I0} - \mathcal{E}_{I4}$] интервалом энергии, обусловленными концентрациями (C) или интенсивностями облучения (I) агентов разной природы (химические, физические) т.е. $T=cost$ и $f(\mathcal{E}_c)$ или $f(\mathcal{E}_I)$;

Биологический процесс полной кинетикой (min-max-min) $F_{0min} - F_{2max} - F_{4min}$ значениями частот получили (рис. 1) действием определенной величины энергии ($\mathcal{E}=cost$), обусловленной концентрацией ($\mathcal{E}_c=cost$), или интенсивностью ($\mathcal{E}_I=cost$) и интервала времени [t_0-t_4], т.е. $\mathcal{E}_c=cost$ или $\mathcal{E}_I=costf(t)$.

Полученные результаты показали, что тот же биологический процесс полной кинетикой (min-max-min) у организма *in vivo* вызывается независимо от формы обработки, что и свидетельствует о том, что биологический процесс вызывается действием единого, общего фактора, которым является результат взаимодействия двух параметров – энергии и времени, что и выражается понятием дозы ($D=\mathcal{E}T$).

Это становилось убедительным (рис.2), когда биологический процесс полной кинетикой (min-max-min) при двух формах обработки 1) $\mathcal{E}=costf(t)$ и 2) $T=costf(\mathcal{E})$ вызывался равноценными значениями частот $F_0=F_0'$; $F_1=F_1'$; $F_2=F_3=F_3'$; $F_4=F_4'$ при

действиях, соответствующих дозам $D_0; D_1; D_2; D_3; D_4$, которые были обусловлены $T = \text{costf}(\Theta)$ или $\Theta = \text{costf}(t)$.

Это фактические результаты, подтверждая то, что доза является результатом двух параметров энергии и времени ($D = \Theta T$), подвергались более глубокому анализу согласно закону диалектики «причина ↔ следствие» с двумя направлениями, которое позволило выявить закономерности как по отношению к дозам, так и по отношению к процессам.

III. а) Конкретные величины дозы [$D_0; D_1; D_2; D_3; D_4$] (рис. 1) вызывая биологический процесс конкретными величинами частот ($F_0; F_1; F_2; F_3; F_4$), свидетельствует о том, что как биологический процесс, так и доза имеют дискретный характер;

б) Разные величины доз $D_0; D_1; D_2; D_3; D_4$ интервала [$D_0 - D_4$] (рис.2), вызывая один и тот же процесс, являются гомогенными по отношению к данному процессу, а по отношению к разным величинам частот этого же процесса являются гетерогенными.

в) Тот же процесс, вызываясь интервалом дозы [$D_0 - D_1$] по отношению к величинам разных доз этого интервала является гомогенным, а по отношению к значениям частот этого же процесса, является гетерогенным.

г) На рис. 1; 2 видно, что биологический процесс полной кинетикой (min-max-min) в действительности $F_0 \dots F_1 \dots F_2 \dots F_3 \dots F_4$ значениями частот вызывается непрерывно при действии непрерывных величин доз - $D_0 \dots D_1 \dots D_2 \dots D_3 \dots D_4$, что и свидетельствует о том, что как доза, так и биологический процесс имеют непрерывный характер, который не может подвергаться экспериментальному изучению, а вытекает из логического мышления.

IV. Особый интерес представляет анализ результатов, полученных при изучении биологических процессов полной кинетикой (min-max-min). (например, разные биологические процессы А, Б, В), происходящих в том же организме *in vivo*, который дает возможность выявить закономерности взаимосвязи между этими процессами.

а) На рис 3 видно, что отдельные процессы А; Б; В; полной кинетикой (min-max-min) в том же организме проходят под действием интервалов доз $[0-D_1]; [0-D_2]; [0-D_3]$ дискретно.

б) Непрерывное увеличение числа интервалов доз $[0-D_1] \dots [0-D_2] \dots [0-D_3]$ приводит к непрерывному увеличению числа вызывающих процессов (А.....Б.....В), то есть биологические процессы имеют непрерывный характер.

в) Разные величины интервалов доз $[0-D_1] < [0-D_2] < [0-D_3]$, вызывая разные биологические процессы полной кинетикой (min-max-min) в организме, обеспечивают чередование этих процессов $A \rightarrow B \rightarrow V$.

г) Если на рис. 3 обратить внимание на определенную величину дозы (D_0) ближе к нулю, при которой вызываются разные биологические процессы А; Б; В, то эти процессы одновременно происходят разной величиной частот $F_A; F_B; F_V$. Это значит, что доза (D_0) имеет относительный и гетерогенный характер по отношению к этим процессам. А эти процессы А; Б; В, в свою очередь, вызываясь под действием определенной величины доз (D_0), характеризуются гетерогенностью и относительностью.

На основе этих данных можно сделать вывод, что эти закономерности – дискретность, непрерывность, гетерогенность, гомогенность, относительность и чередование биологических процессов и дозы обеспечивают взаимосвязь между процессами, происходящими в организме. Такими же закономерностями обусловлена взаимосвязь между организмами, которые можно выявить изучением определенного биологического процесса у разных организмов – А, Б, В (рис.3).

V. Существенное значение имеет взаимосвязь взаимодействия двух параметров дозы ($D = \Theta T$) при вызывании биологического процесса в организме *in vivo*. Параметр

дозы – энергия, как общий вектор действия разных агентов (химическая, физическая и т.д.) разными концентрациями (с) и интенсивностями облучения (I), имея разные величины энергии, можно представить соответственно $\mathcal{E}_1 > \mathcal{E}_2 > \mathcal{E}_3$ и $\mathcal{E}_1 > \mathcal{E}_2 > \mathcal{E}_3$.

а) На рис. 4 полученные результаты методом «доза-эффект» показывают, что при действии определенных величин параметров – $\mathcal{E}_1 = \text{const}$; $\mathcal{E}_2 = \text{const}$; $\mathcal{E}_3 = \text{const}$ и $\mathcal{E}_1 = \text{const}$; $\mathcal{E}_2 = \text{const}$; $\mathcal{E}_3 = \text{const}$, которые по величине составляют с одной стороны уменьшающийся ряд, а с другой стороны – увеличивающийся ряд:

$$\infty \leftarrow \mathcal{E}_1 > \mathcal{E}_2 > \mathcal{E}_3 > \dots > \mathcal{E}_1 > \mathcal{E}_2 > \mathcal{E}_3 \rightarrow 0$$

вызывают биологический процесс полной кинетикой (min-max-min), изменяя интервал времени $[0-t]$, при котором происходит этот процесс *in vivo*, с одной стороны с увеличением энергии уменьшается интервал времени, а с другой – с уменьшением энергии увеличивается интервал времени, т.е, интервал времени происходящего процесса обладает скоростью:

$$0 \leftarrow [0-t_1] < [0-t_2] < [0-t_3] < \dots < [0-t_4] < [0-t_5] < [0-t_6] \rightarrow \infty.$$

Интервал времени стремится к нулю, когда бесконечно увеличивается величина энергии ($\mathcal{E} \rightarrow \infty$), то есть, биологический процесс происходит мгновенно, скачкообразно, а с другой стороны, интервал времени стремится к бесконечности - $[0-t] \rightarrow \infty$, когда величина энергии принимает нулевое значение ($\mathcal{E} \rightarrow 0$), то есть, процесс *in vivo* происходит спонтанно.

Эти фактические существующие свойства – скачкообразность и спонтанность, происхождения биологического процесса *in vivo* невозможно подвергать к экспериментальному изучению, они вытекают из логического мышления.

VI. Исходя из того, что процессы фенотипа и генотипа представляют особый, важный интерес в познании сущности механизма биологического процесса, [15], проводим изучение процесса морфологического изменения методом «доза-эффект» подобно изучению биологического процесса, происходящего в организме *in vivo*, используя те же условия изучения.

а) под действием дозы вызвали морфологические изменения у микроорганизма, суспензия клеток которого в норме являлась гомогенной (фото 1.) Эти клетки под действием дозы изменились, превращаясь в большие круглые (фото 2), палочкообразные (фото 3) неделившиеся клетки. Каждое из этих изменений происходит как процесс полной кинетикой (min-max-min) при действии интервала дозы $[D_0-D_4]$ (рис. 1,2), а при разных изменениях морфологии (а, б, в,) интервалами доз соответственно $[0-D_1]$; $[0-D_2]$; $[0-D_3]$ (рис. 6).

Анализ при этом выявил, что процесс морфологического изменения обладает теми же закономерностями, что и биологический процесс, происходящий в организме *in vivo*: дискретность, непрерывность, гомогенность и гетерогенность, относительность, скачкообразность, спонтанность и чередование, кроме того, обеспечивают взаимосвязь между процессами морфологических изменений (большие круглые клетки – А $\rightarrow$ палочковидные – Б $\rightarrow$ неделившиеся клетки – В), обусловленным дозой ($D = \mathcal{E}T$) (рис. 3).

VII. Исходя из того, что ключом выявления сущности механизма является взаимосвязь между процессами генотипа и процессами фенотипа [Inge-Vechtomov, S. G.-2005], нам пришлось изучать ее методом «доза-эффект», строго сохраняя условия обработки, при которых происходили мутационный процесси процес с морфологического изменения *in vivo* одновременно. (рис. 5).

а) Вызывая определенный мутационный процесс (например – мутации по аминокислоте $\text{Iей}^- \rightarrow \text{Iей}^+ - \text{A}_2$) и процесс морфологического изменения (образование больших круглых клеток - а) полной кинетикой (min-max-min) у микроорганизма *in vivo* (рис. 5), обнаружили, что оба эти процесса полной кинетикой (min-max-min) происходят действием общего интервала дозы $[D_0 - D_2]$ (рис. 5), одновременно,



90

лей⁺-А), происходящим внутри организма *in vivo*, и процессом морфологического изменения -а у этого же организма существует прямая корреляционная связь.

б) Глубокое изучение этого явления – корреляции методом «доза-эффект» при тех же условиях обработки выявило, что чередующие разные мутационные процессы (лей⁻→лей⁺ - А; arg⁻→arg⁺Б; lys⁻→lys⁺ - В) (рис. 6) и чередующие процессы морфологических изменений (образование больших круглых - а→палочковидных – б→неделившихся клеток-в) проходят одновременно действиями интервалов доз соответственно [Д₀-Д₁]; [Д₀-Д₂]; [Д₀-Д₃] (рис. 6) у того же организма, при которых мутационный процесс – А коррелируется с процессом морфологического изменения - а, мутационный процесс – Б с процессом морфологического изменения – б, мутационный процесс - В с процессом морфологического изменения – в, одновременно принимая min-max-min значения частот у того же организма *in vivo*. Констатируя результаты, полученные анализом согласно закону диалектики «причина ↔ следствие», получаем: энергия (Э) как единый вектор характеризует все агенты разной природы, разные концентрации и интенсивности облучения, отличающиеся по величине, которая является одним из параметров действия дозы (Д=ЭТ). А доза, в свою очередь, является результатом взаимодействия двух параметров энергии и времени (Д=ЭТ), с помощью которой обнаружен ряд закономерностей, характеризующих как дозу, так и биологический процесс: дискретность, непрерывность, гомогенность, гетерогенность, относительность, чередование, скачкообразность и спонтанность, и явление корреляции как взаимосвязь между процессом генотипа, происходящим в организме и процессом фенотипа (морфологического изменения)*in vivo*. Эти все явления корреляции как взаимосвязь между процессом генотипа, происходящим в организме и процессом фенотипа (морфологического изменения)*in vivo*. Эти все явления являются необходимыми и достаточными условиями для утверждения «квантовой теории» (15), что механизм биологического процесса *in vivo*, имея физическую природу, из себя представляет квантовый переход в биологическом материале *in vivo*. Эта «квантовая теория» незаметно развивалась (13) и развивается до наших дней (10, 22, 17, 18, 20, 21,22) без доказательства результатов исследования биологических процессов *in vivo*.

Есть надежда, что такой механизм биологического процесса со своими закономерностями подвергся более глубокому изучению, приводит к направленному решению возникающих проблем в биологии, медицине, сельском хозяйстве и т.д.

Литература

1. Алиханян С.И. «Некоторые вопросы механизма индуцированного мутагена в кн. Экспериментальный мутаген у животных, растений и микроорганизмов», тезисы докладов, стр. 25-50, 1965.
2. Алиханян С.И. Лекция промышленных микроорганизмов «Наука» 1968, стр. 39-392;
3. Алиханян С.И. «Молекулярный механизм мутагена в современной генетике», 1967, стр. 195.
4. Аэрбах Ш. «Проблемы мутагенеза», изд. «Мир», 1978, стр. 465.
5. Базржев, «Проблема причинности в генетике», автор дис. Наука, М, 1988, стр. 16;
6. Болика А.Д. «Методологические проблемы мутационной концепции», автореферат дис. на соис. у ген. степ. Философ. Наук, М., 1971, стр. 20.
7. Надсон Г.А. «О действии радия на дрожжевые грибки в связи с одной проблемой влияния радия на живое вещество», II Вестник рентгенологии и радиологии, 1920 I 1, стр. 45-317.
8. Надсон Г.А., Кудрявцев В.И. «Об амёбообразной форме клеток у дрожжей, передаваемой по наследству», II Микробиолог. жур. 1927, I 5, стр. 165-168.
9. Надсон Г.А., Рохлина Э.Н., «О поле действия, поле смерти и биологической дозиметрии», II Вестник рентгенологии и радиологии, 1934, Т. В. 1-2, 23-34.
10. Намиот В. А. «Многомировая интерпретация квантовой теории и фундаментальные проблемы биофизики», Биофизика, 2014, том. 59, вып. 1, стр. 202-208.

11. Петров Д. Ф., «О некоторых философских вопросах учения о материальных основах наследственности», II, вопросы философии, 1958, N 7, стр. 102-112.
12. Тарасов В.А. «Молекулярный механизм репарации мутагена», М. изд. «Наука», 1982, стр. 226.
13. Тимофеев-Ресовский Н.В., Иванов В.И., Глотов Н.В., «Некоторые вопросы радиационной генетики», II, Актуальные современной генетики, М., 1966, стр. 412-433.
14. Тюрютиков Е. Ф., «Некоторые методологические аспекты в изучении наследственности», II, Науч. труд. Рязанского мед. инст., 1970, I 29, стр. 318-335.
15. Шредингер Э. «Что такое жизнь с точки зрения физики», М., 1972, стр. 88.
16. Crick F.H., Barnett L., Brenner B., Watts-Telin R.I. «General Nature of the Genetic Code for Proteins», N., Nature, 1961, Vol. 192, p. 1227-1232.
17. Bordonaro M, Ogryzko V. Quantumbiology at the cellular level-elements of the research program, Bio system 2012, 112-30.
18. Djordjevic Y.B. Quantum Information Processing and Quantum Error Correction, Elsevier, Amsterdam. The Netherland Academic Press, Boston, M.A. USA, 2012.
19. Freeze F. «Molecular Mechanism Mutations, Molecular Genetics», 1963, Part 1, Ch. V. 2 ed.
20. Djordjevic Y.B., Markov, Chain-Like Quantum Biological Modeling of Mutations, Aging and Evolution, Life (Basel) 2014, Sep., 5 (3) 1518-1538.
21. Melkikh A.V.E., Nonlinearity of Quantum mechanics and of the problem of wave function, Commun. Phys., 2015, 64-47.
22. Mond I. «Hasard et Necessite sur la philosophie naturelle de fiologie modern», Paris, 1970.
23. Inge-Vecht S. G. «Abstracts papers by young scientists», Yerevan, September 8-11, 2005, p. 35.
24. Mild D. «The Sperm morphology test a rapid in vivo for germinal mutations», Bga-Schr. Inst Veteriner mod sundesges undtheit sant, 1984 N 3, p. 299-306.

Biol. Journal of Armenia, 1 (69), 2017

ISOFORMS OF ADENOSINE DEAMINASE1 IN SYNOVIAL FLUIDS AT DIFFERENT ARTHRITIS

A.A. ANTONYAN, L.G. KARAPETYAN, S.G. SHAROYAN, S.S. MARDANYAN

*H.Ch. Buniatian Institute of Biochemistry NAS RA
biochem@ipia.sci.am*

The significant elevation of adenosine deaminase activity in synovial fluids of patients at different joint disorders was observed. It was shown that the enzyme level can be used as a statistically significant, specific and sensitive biochemical marker for distinguishing the rheumatoid and osteoarthritis. Moreover, it appeared that in the case of rheumatoid arthritis the elevation of the enzyme activity in synovial fluid takes place mainly via increasing of small-molecular adenosine deaminase. In the cases of ankylosing spondylitis, reactive arthritis, gout and juvenile idiopathic arthritis this regularity was not registered.

Adenosine deaminase– arthritis– synovial fluid–biochemical marker

Հոդերի ախտաբանական խանգարումներով հիվանդությունների սինովիալ հեղուկում գրանցվել է ադենոզին դեամինազ 1-ի ակտիվության զգալի բարձրացում: Ցույց է տրվել, որ ֆերմենտի ակտիվությունը կարող է օգտագործվել օստեո- և ռևմատոիդային արթրիտների տարբերակման վիճակագրորեն զգալի, սպեցիֆիկ և զգայուն կենսաքիմիական ցուցանիշ: Պարզվել է, որ ռևմատոիդային արթրիտի դեպքում սինովիալ հեղուկում ֆերմենտի ակտիվությունը բարձրանում է ֆերմենտի ցածրամոլեկուլային ձևի աճի հաշվին, որը չի գրանցվել անկիլոզացնող սպոնդիլոարթրիտի, ռեակտիվ արթրիտի, հոդատապի (պոդագրա) և պատանեկանի դիոպաթիկ արթրիտների դեպքում:

Наблюдалось значительное повышение активности аденозин дезаминазы 1в синовиальной жидкости больных при различных суставных заболеваниях. Было показано, что уровень активности фермента может быть использован в качестве статистически значимого, специфического и чувствительного биохимического маркера для различения остео- и ревматоидного артритов. Оказалось, что в случае ревматоидного артрита повышение активности фермента в синовиальной жидкости происходит главным образом за счет увеличения низкомолекулярной аденозин дезаминазы. В случаях анкилозирующего спондилоартрита, реактивного артрита, подагры и ювенильного идиопатического артрита эта закономерность не регистрируется.

Аденозин дезаминаз-артриты-синовиальная жидкость-биохимический маркер

Arthritis is one of the common causes of people's disability in the world. More than 54.4 million adults have doctor-diagnosed arthritis, and by the year 2040 this number of US adults is expected to be 78 million. There are 100 different forms of arthritis. Inflammatory joint diseases are heterogeneous group of disorders afflicting not only joint tissues but often multiple organs in the body. The group of the joints disorders includes rheumatoid arthritis (RA), osteoarthritis (OA), ankylosing spondylitis, reactive arthritis (ReA), psoriatic arthritis, juvenile idiopathic arthritis (JIA), etc. According to the studies of European and North American populations, among these diseases RA is the most common, affecting 0.5–1% of the population. It is a chronic, progressive and disabling autoimmune disease that causes inflammation in the joints, the tissue around the joints, and other organs in the human body [14]. RA results in swollen and painful joints. It is characterized by extracellular matrix degradation, destruction and loss of function of joint cartilage. OA is degenerative joint disorder which results in pain and deformity, ultimately leading to chronic disability. It is becoming a significant medical and financial burden in a world. Optimal management requires early diagnosis and awareness of the risk factors affected the prognosis.

Currently, diagnosis of inflammatory diseases of the joints is carried out on the basis of the adopted classification criteria. Depending on the expected type, the clinical examination may be supported by radiology and/or blood analysis [4]. At present, a great task is the identification of biomarkers, which can help in differentiating the arthritis type. This is important for applying the appropriate treatment. Obviously, the analysis of synovial fluid (SF) might provide more targeted option to research and differentiate the arthritis. As a biomarker for differentiating the etiology of joint diseases, adenosine deaminase activity level in SF has been considered also [15].

Adenosine deaminase (ADA, EC 3.5.4.4) is an important enzyme in purine metabolism. It is involved in the breakdown of adenosine (Ado), catalyzing its irreversible hydrolytic deamination to inosine [6]. The enzyme is presented in all mammalian tissues. Its primary function in humans is development, differentiation, and maturation of the lymphoid system [7]. Two molecular isoforms of the enzyme are known. The small form of human ADA (SADA) is a catalytically active protein with a relative molecular mass of 36-38 kDa. The large form (LADA, Mm of 280 kDa) represents a complex of SADA with so called ADA binding protein, which is identical with dipeptidyl peptidase IV (DPPIV), a multifunctional enzyme, appearing in many tissues in cell membrane immobilized and circulating forms [8, 3]. The ADA substrate Ado suppresses and mediates the inflammatory processes and is provided with the protective properties against injuries. Its anti-inflammatory function consists in decreasing of pro-inflammatory and increasing of anti-inflammatory cytokines, in cytokine modulation of macrophages and monocytes and regulation of inflammatory function of endothelial cells [5]. Hence, DPPIV-bound extra cell LADA participates in regulation of Ado concentration in physiological fluids [9]. In inflammation, a tissue injury brings to the enhancing of ADA activity in the extra cellular medium: SF and the effusions of different pathology. This promotes the decreasing of

concentration of the anti-inflammatory Ado and aggravation of inflammation. The increase of ADA activity has been observed in such pathologies as tuberculosis [11], cancer [13], rheumatoid arthritis [12], etc.

The evaluation of ADA activity level is considered as a reasonable approach in the diagnosis of some diseases. It was assumed also as a reasonable test for distinguishing at least of two type arthritis, RA and OA. ADA activity in SF from patients at inflammatory joint diseases is significantly higher than at non inflammatory diseases [15]. We studied the activity of ADA in SFs of 140 patients of Armenian clinics (57 RA and 83 OA) [1].

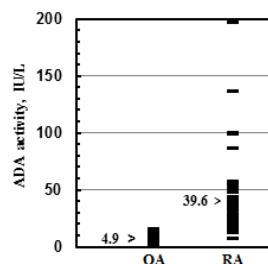


Fig.1.The ADA activity in SFs of patients, diagnosed as osteoarthritis (OA) and rheumatoid arthritis (RA). The mean values of the activities are indicated by arrows.

The analysis evidenced a statistically significant ($p < 0.0001$) difference between the activity levels in SFs from knee joint of two groups. Fig. 1 shows the experimental points, representing the enzyme activity in SFs of patients, diagnosed as OA and as RA. The mean values of the enzyme activity for these groupswere 4.9 ± 0.5 IU/Land 39.6 ± 4.5 (mean $\pm$ S.E.M.) IU/L, respectively.Based on the ADA cutoff value of 12 IU/L, the parameters for RA and OA differentiation were evaluated as: 94.4% – sensitivity, 93.9% – specificity and 94.1% – efficiency. Hence, our study contributed into consideration of the ADA activity level in SFs as an additional, suitable for fast and low-cost differential diagnostic test of RA and OA, particularly, in Armenian population.The difference between ADA activities in SFs of RA and OA patients had been recommended also in the arthritis diagnosis in Japan, Iran, etc. [12, 10]. It is worth of note that the cut off values in different populations are different.

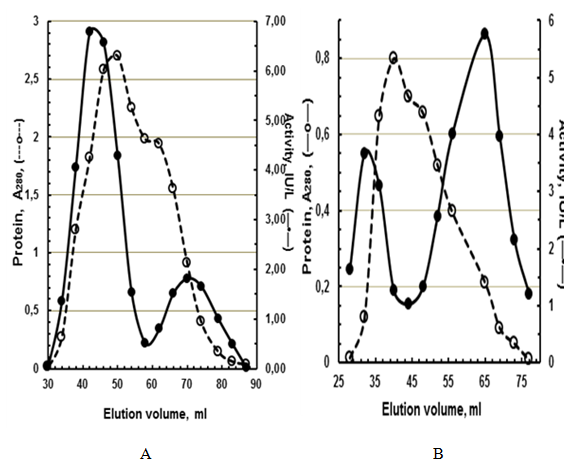


Fig. 2. The elution diagrams at gel-filtration through the column with Sephadex G-200of SFs with the initial ADA activity of 30.5 IU/L (A) and 98.9 IU/L (B)

The ratios of small- to large-molecular forms of ADA in the SFs of RA patients with different levels of the total activity were compared [2]. Two forms of ADA were separated by gel-filtration through the column with Sephadex G-200. The SF samples with the initial ADA activity below and above the statistical mean value for RA patients (39 IU/L) were analyzed in triplicate. Fig. 2 shows the presentable couple of the diagrams obtained at gel filtration of SFs with the initial ADA activity of 30.5 IU/L (A) and of 98.9 IU/L (B). These diagrams manifested the increasing of small- to large- molecular isoforms ratio from 0.27 in (A) to 1.57 in (B). Apparently, for the increasing of ADA-activity in RA-SF mainly SADA is responsible.

Unfortunately, we did not have the opportunity to investigate the SFs from patients with these diseases in amounts sufficient for performing statistical analysis.

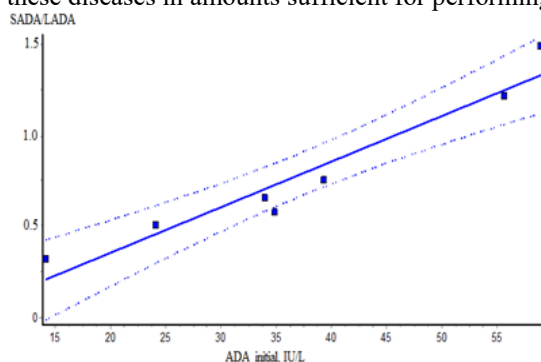


Fig. 3. The linear correlation curve between the total ADA activity and the ratio of SADA to LADA isoforms of the enzyme in the SFs of RA patients, ($r = 0.96$; $p = 0.0005$).

Table 1. The ratios of ADA isoforms in the SFs at different arthritis.

Arthritis type	Activity	SADA/LADA
Reumathoid arthritis	55.7	1.12
Reactive arthritis	63.5	0.20
Ankylosing spondylitis	56.9	0.15
Gout	53.7	0.31
Juvenile idiopathic arthritis	60	0.26

Table 1 demonstrates the ratios of the isoforms in the SFs with the close levels of ADA from the patients of different arthritis, evaluated after gel filtration.

Conclusions: The ADA activity in SFs can be used as a statistically significant, specific and sensitive biochemical marker for differentiating the RA and OA. In RA, the ADA activity elevation takes place mainly via increasing of SADA. In the cases of the other arthritis (e.g. ankylosing spondylitis, reactive arthritis, gout, juvenile idiopathic arthritis) this regularity is not registered.

Acknowledgment. This work was supported by Ministry of Education and Science of the Republic of Armenia (Agreement G-16).

References

1. Antonyan A.A., Haroyan A.A., Harutyunyan R.A., Sharoyan S.G., Mardanyan S.S. Adenosine Deaminase Activity in Synovial Fluid at Arthritis. Proceedings of the YSU. Chemistry and Biology, 3, 28–32, 2013.

2. *Antonyan A.A., Sharoyan S.G., Haroyan A.A., Harutyunyan R.H., Mardanyan S.S.* Adenosine Deaminase Isoforms in synovial fluid at Rheumatoid arthritis. Proceedings of the YSU. Chemistry and Biology, 2, 54-58, 2014.
3. *Antonyan A.A.* Natural substrates of dipeptidyl peptidase IV. Proceedings of the YSU, Chemistry and Biology, 2, 33-42, 2016.
4. *Arnett F.C., Edworthy S.M., Bloch D.A., et al.* The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum., 31, 315-324, 1988.
5. *Chan E.S.L., Fernandez P., Cronstein B.N.* Adenosine in inflammatory joint diseases. Purinergic Signalling, 3, 145-15, 2007.
6. *Daddona P. E.* Human adenosine deaminase. J. Biol. Chem., 256, 12496-12501, 1981.
7. *De Meester I., Vanham G., Kestens L., et al.* Binding of adenosine deaminase to the lymphocyte surface via CD26. Eur. J. Immunol., 24, 566-570, 1994.
8. *Dong R.P., Kameoka J., Hegen M., et al.* Characterization of adenosine deaminase binding to human CD26 on T cells and its biologic role in immune response. J Immunol., 156, 1349-1355, 1996.
9. *Kameoka J., Tanaka T., Nojima Y., et al.* Direct association of adenosine deaminase with T cell activation antigen, CD26. Science, 261, 466-469, 1993.
10. *Manivelavan D., VijayaSamundeeswari C.K.* Synovial fluid biomarkers in differentiating between inflammatory and noninflammatory arthritis. International Journal of Basic Medical Science, 3, 49-53, 2012
11. *Mardanyan S.S., Sargisova Y.G., Andreasyan N.A., et al.* Activity of Adenosine Deaminase of Pleural Fluid at Tuberculosis Pleuritis. Problemy Tuberculeza (russ), 2, 37-39, 2002.
12. *Nakamachi Y., Koshiba M., Nakazawa T. et al.* Specific Increase in Enzymatic Activity of Adenosine Deaminase 1 in Rheumatoid Synovial Fibroblasts. Arthritis & Rheumatism, 48, 668-674, 2003.
13. *Rai B., Kaur J., Jacobs R., Arnand S.C.* Adenosine deaminase in saliva as a diagnostic marker of squamous cell carcinoma of tongue. Clin. Oral Invest. 15, 347-349, 2011.
14. *Shenkman J.* Living with Arthritis. New York: Franklin Watts, 1990.
15. *Zakeri Z., Izadi S., Niazi A., et al.* Comparison of adenosine deaminase levels in serum and synovial fluid between patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Int. J. Clin. Exp. Med., 5, 195-200, 2012.

Biol. Journal of Armenia, 1 (69), 2017

THE RADICAL SCAVENGING ACTIVITY OF SOME SPECIES OF ARTEMISIA GENUS, REPRESENTED IN ARMENIAN FLORA

A. BABAYAN, M. PETROSYAN, N. SAHAKYAN, A. TRCHOUNIAN

*Yerevan State University, Department of Biochemistry, Microbiology and Biotechnology,
anush.babayan.90@mail.ru*

Plants are valuable sources of antioxidants which could have beneficial effect on human health. Recent investigations have shown that the antioxidant properties of plants could be correlated with oxidative stress defense and different human diseases. In this respect flavonoids and other polyphenolic compounds have gained the greatest attention. The present study was undertaken to evaluate the *in vitro* antiradical activity of different extracts (ethanol, hexane, acetone, chlorophorm and methanol) of *Artemisia vulgaris* (L.), *A. fragrans* (Willd.), *A. absinthium* (L.) and *A. splendens* (Willd.) represented in Armenian flora. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay was used to measure the radical scavenging activity of extracts obtained from Artemisia subspecies aerial parts. Catechin was used as a positive reference. Different concentrations of extracts were used and results were expressed with IC₅₀ values.

Artemisia vulgaris, *A. fragrans*, *A. absinthium*, *A. splendens*, DPPH, antiradical activity.

The *Artemisia* genus plants species belonging to the Asteraceae family which contain secondary metabolic products with high biological activity are widely used in medicine, cosmetic and food industry. About 300 species of this genus are known and 16 from them are described for Armenian flora.

These herbs have been used worldwide in folk medicine since ancient times. They have been used as tonics, antimalarials, antihelmintics, and antidiabetics, and in treating wounds, bronchitis, ulcers, and tuberculosis [1]. There are also several reports concerning the antimalarial, antioxidant, cytotoxic, antipyretic, analgesic, antidiabetic, antimicrobial, and antifungal activities of different *Artemisia* species [2]. The chemical studies on *Artemisia* species indicate that all classes of compounds are present in the genus with particular reference to terpenoids and flavonoids. The rich accumulation of essential oils and other terpenoids in the genus is responsible for using of various species for flavouring foods or liqueurs [3,4].

The active components of these plants include flavonoids, coumarins, sesquiterpene lactones, volatile oils, inulin, and traces of alkaloids. The chief compounds of volatile oils include camphor, camphene, 5-thujone, germacrene D, 1,8-cineole, and C-caryophyllene [5].

Changing environmental conditions are giving rise to a variety of free radicals, which plants have to deal with them in order to survive. Reactive oxygen species, such as singlet oxygen, superoxide ion, hydroxyl ion and hydrogen peroxide, are highly reactive, toxic molecules, which are generated normally in cells during metabolism. They cause severe oxidative damage to proteins, lipids, enzymes and DNA by covalent binding and lipid peroxidation, with subsequent tissue injury. Natural antioxidant agents have attracted much interest because of their ability to scavenge free radicals [6]. Free radicals have been implicated in the development of a number of disorders, including cancer, neurodegeneration and inflammation, giving rise to studies of antioxidants for the prevention and treatment of diseases. The presence of antioxidants such as phenolics, flavonoids, tannins and proanthocyanidins in plants may provide protection against a number of diseases; for example, ingestion of natural antioxidants has been inversely associated with morbidity and mortality from degenerative disorders [7]. Medicinal plants are therefore being investigated for their antioxidant properties, and the demand for natural antioxidants and food preservatives is increasing [8].

The aim of our investigation was to study the dependence of radical scavenging activity on *A. vulgaris*, *A. fragrans*, *A. absinthium*, *A. splendens* extraction conditions.

Material and methods

Plant material. The investigated plants *A. vulgaris* L., *A. fragrans* Willd., *A. absinthium* L. and *A. splendens* Willd. were collected from Aragatsotn region (Armenia, Mughni, 1500-1600 m above sea level, N 40° 22.085', E 44° 22.815') during the flowering period.

Extract preparation. Plant material was dried at 60°C for 24h. 1 g powdered dried plant material was homogenized in 10 to 15 mL solvent (ethanol, hexane, methanol, acetone and chloroform) and left overnight at ~10°C. Extract was centrifuged for 5 minutes at 5000 rpm, and the supernatant was isolated. The precipitate was extracted by 4 - folds, and the combined supernatant was dried by evaporation at room temperature. The evaporated mass was solved in ethanol, and the extracts in different dilutions were used.

Determination of radical scavenging activity. Scavenging free radical potentials were determined in ethanol solution of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) [9]. Catechin was used as standard. Sample solution contained 125 µL (1mM) DPPH, 375 µL ethanol

and 500 μ L of test-solution (extract and catechin with different concentrations (1000 μ g/ml, 500 μ g/ml, 100 μ g/ml, 50 μ g/ml and 10 μ g/ml respectively)). Test-solution was replaced by ethanol in the control sample. The absorbance was measured at the wave length of 517 nm using spectrophotometer Genesys 10S UV-Vis (Thermo Scientific USA).

The radical scavenging activity was calculated using the following formula:

$$\text{Radical scavenging activity (\%)} = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100,$$

where A_c is absorbance of control (DPPH without the addition of test solution), A_s is sample absorbance. IC_{50} calculated denote the concentration of investigated samples required to decrease the DPPH absorbance at 517 nm by 50%.

Results and discussion

DPPH is widely used to test the ability of compounds to act as free radical scavengers or hydrogen donors. The DPPH assay indicated the antiradical activity of *A. vulgaris* L., *A. fragrans* Willd., *A. absinthium* L. and *A. splendens* Willd. extracts; the antiradical properties of the studied samples are expressed in figure 1 and figure 2 (data were express as IC_{50} – the extract concentration which neutralize the 50 % of DPPH free radicals). The scavenging effect (IC_{50} value) was in the following order: catechin (standard) (IC_{50} 13.08 μ g/mL (R^2 = 0.93)) (data not shown), *A. vulgaris* methanol (IC_{50} 832 μ g/ml (R^2 = 0.85)), chlorophorm (IC_{50} 931 μ g/ml (R^2 = 0.96)), acetone (IC_{50} 1000 μ g/ml (R^2 = 0.93)), ethanol (IC_{50} 7407 μ g/ml (R^2 = 0.99)) and hexane (IC_{50} 48077 μ g/ml (R^2 = 0.99)) extracts; *A. fragrans* methanol (IC_{50} 87 μ g/ml (R^2 = 0.68)), chlorophorm (IC_{50} 98 μ g/ml (R^2 = 0.84)), acetone (IC_{50} 307 μ g/ml (R^2 = 0.85)), hexane (IC_{50} 13889 μ g/ml (R^2 = 0.98)) and ethanol (IC_{50} 16129 μ g/ml (R^2 = 0.78)) extracts; *A. absinthium* acetone (IC_{50} 311 μ g/ml (R^2 = 0.84)), methanol (IC_{50} 1103 μ g/ml (R^2 = 0.92)), ethanol (IC_{50} 1466 μ g/ml (R^2 = 0.99)), hexane (IC_{50} 1664 μ g/ml (R^2 = 0.99)) and chlorophorm (IC_{50} 1831 μ g/ml (R^2 = 0.99)) extracts; *A. splendens* methanol (IC_{50} 734 μ g/ml (R^2 = 0.89)), chlorophorm (IC_{50} 897 μ g/ml (R^2 = 0.93)), acetone (IC_{50} 998 μ g/ml (R^2 = 0.96)), hexane (IC_{50} 24509 μ g/ml (R^2 = 0.91)) and ethanol (IC_{50} 125000 μ g/ml (R^2 = 0.78)) extracts.

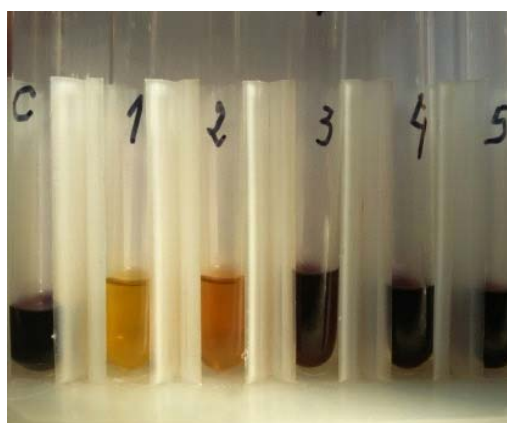


Fig. 1. The DPPH scavenging activity of *Artemisia fragrans* acetone extract 1.0; 0.5; 0.1; 0.05; 0.01 mg/ml 1-5, C – control.

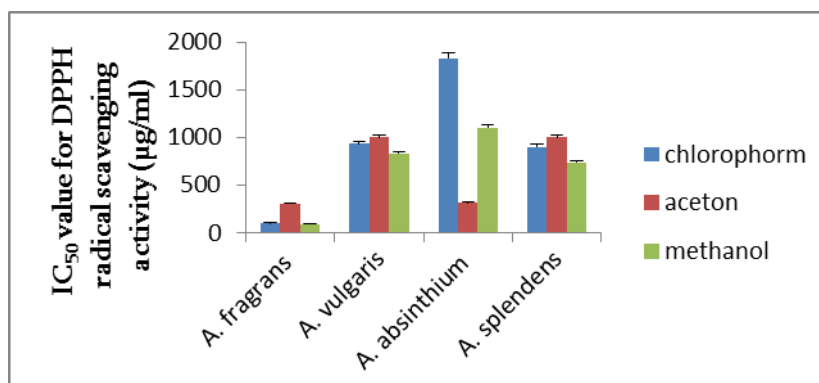


Fig. 2. The radical scavenging activity of chlorophorm, acetone and methanol extracts of *A. vulgaris*, *A. fragrans*, *A. absinthium*, *A. splendens*, expressed with IC_{50} .

The radical scavenging activity value of investigates extracts was correlated with the total phenolic content (data not shown).

The results show that hexane and ethanol extracts did not express any radical scavenging activity, so the further investigations were carried out with the most active fractions.

Conclusions

According to our investigation data it was possible to conclude that the highest antiradical activity possess the *A. fragrans* chlorophorm and methanol extracts, whereas the others have moderate (in case of acetone extract) or low activity.

References

1. Uzun E., Sariyar G., Adersen A., Karakoc B., Otuk G., Oktayoglu E., Pirildar S., 2004. Traditional medicine in Sakarya province (Turkey) and antimicrobial activities of selected plants / Journal of Ethnopharmacology, v. 95, 287-296.
2. Kalembe D., Kusewicz D., Swiader K., 2002. Antimicrobial properties of the essential oil of *Artemisia asiatica* Nakai. / Phytotherapy Research, v. 16(3), 288-291.
3. Erel S.B., Reznicek G., Senol S.G., Yavasogulu N.K., Konyalioglu S., Zeybek A.U., 2012. Antimicrobial and antibacterial properties of *Artemisia* L. species from western Anatolia / Turkish Journal of Biology, v. 36, 75-84.
4. Humara W., Shakeel A. Sh., Javid A. B., 2014. Chemical composition and antioxidant activity of the leaf essential oil of *Artemisia absinthium* growing wild in Kashmir, India / The Journal of Phytopharmacology, v. 3(2), 90-94.
5. Bamoniri A., Mirjalili B. B., Mazoochi A., Batooli H., 2010. Chemical composition of *Artemisia vulgaris* L. from Kashan area isolated by nano scale injection / Iranian Journal of Organic Chemistry, v. 2(4), 533-536.
6. Shoib A.B., Shahid A.M., 2015. Determination of total phenolic and flavonoid content, antimicrobial and antioxidant activity of a root extract of *Arisae majacquemontii* Blume / Journal of Taibah University for Science, v. 9(4), 449-454.
7. Gulcin I., 2012. Antioxidant activity of food constituents: an overview / Archives of Toxicology, v. 86 (3), 345-391.
8. W. Peschel, F. Sanchez-Rabeneda, W. Dieckmann, A. Plescher, I. Gartzia, , D. Jimenez, R. Lamuela-Raventos, S. Buxaderas, C. Codina, 2006. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruits wastes / Food Chemistry, v. 97, 137-150.
9. Apak R, Gorinstein S, Böhm V, Schaich K.M., Özyürek M, Güçlü K., 2013. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report) / Pure and Applied Chemistry, v. 85(5), 957-998.

BEHAVIOR OF TWO PURINE AND PYRIMIDINE METABOLISM RELATED KEY REGULATIVE ENZYMES IN NORMAL AND PATHOLOGICAL CONDITIONS

DANIELYAN K.E.^{1*}, SIMONYAN A.A.¹, CHAILYAN S.G.¹

*H. Buniatian Institute of Biochemistry, NASRA, 5/1 ParuyrSevak Street, Yerevan 0014, Armenia
Kristine_danielyan@biochem.sci.am*

Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase-1 (PRPS-1; EC 2.7.6.1) is widely distributed in the human tissues and serves as a regulative key enzyme for purine and pyrimidine metabolism, whereas Xanthine Oxidoreductase (XOR; EC 1.1.3.22) is the enzyme responsible for the catabolism of purine nucleotides. These enzymes might serve as the aimolecules for triggering of regenerative processes after stroke. In case of inhibition of PRPS-1 and activation of XOR might serve as the targets for prevention of the cancer development. It was recently published in PLOS (Donini S, Garavaglia S, 2017), regulation of these enzymes prevents bioactivity of the pathogenic microorganisms. Thus, investigations of these enzymes' activities in normal and pathological conditions might be vital for the development of new treatment avenues.

Phosphoribosyl pyrophosphate Synthetase, Xanthine Oxidoreductase, experimental stroke

Фосфорибозил пиррофосфатсинтаза (ФРПС-1; EC 2.7.6.1) широко распространена в тканях организма человека и служит в роли регуляторного фермента при метаболизме пуринов и пиримидинов, в то время как ксантин оксидоредуктаза (КОР; EC 1.1.3.22) является ферментом, ответственным за катаболизм пуринов. Эти ферменты могут выступать в роли основных иницирующих регенеративные процессы белков после инсульта. В случае ингибирования (ФРПС-1) и активации (КОР) могут служить в роли мишеней для предотвращения развития раковой опухоли. Недавно было опубликовано в PLOS статья о том (Donini S, Garavaglia S, 2017), что регуляция этих ферментов подавляет биоактивность патогенных микроорганизмов. Таким образом, исследование активности этих ферментов при нормальных и патологических условиях может стать жизненно важным для разработок новых путей лечения.

Ֆոսֆորիբոզիլ-պիրոֆոսֆատսինթազը (ՖՌՊՍ-1; EC 2.7.6.1) լայն տարածում ունի մարդու հյուսվածքներում և ծառայում է որպես կարգավորող ֆերմենտ պուրինների և պիրիմիդինների մետաբոլիզմի համար, այն դեպքում, երբ քսանտին-օքսիդոռեդուկտազը (ԶՕՌ; EC 1.1.3.22) պատասխանատու է պուրինների կատաբոլիզմի համար: Այս ֆերմենտները կարող են հանդես գալ որպես հիմնական ռեգեներատիվ գործընթացները խթանող սպիտակուցներ ինսուլտից հետո: Կարող են հանդես գալ որպես բաղկացիկների զարգացմանը խոչընդոտող թիրախներ, եթե ճշգրիտ մեկի ակտիվությունը (ՖՌՊՍ-1) և խթանել մյուսինը (ԶՕՌ): Վերջերս PLOS-ում (Donini S, Garavaglia S, 2017) տպագրվել է այն միտքը, որ այս ֆերմենտների ակտիվության կարգավորմամբ կարելի է կանխարգելել ախտածին միկրոօրգանիզմների կենսունակությունը: Այսպիսով, այս ֆերմենտների ակտիվության ուսումնասիրությունը ֆիզիոլոգիական և ախտաբանական պայմաններում կարող են դառնալ կենսունակ կարևորություն ունեցող ուսումնասիրություններ նոր բուժման ճանապարհների փնտրտուկում:

We will be discussing two enzymes: one of them is responsible for the synthesis of purine as well as pyrimidine, the other is responsible for purine catabolism.

Phosphoribosylpyrophosphate synthetase-1 (PRPS-1; EC 2.7.6.1) catalyzes the phosphoribosylation of ribose 5-phosphate to 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate, which is necessary for the salvage pathways of purine and pyrimidine, pyridine nucleotide cofactors NAD and NADP, the amino acids histidine and tryptophan biosynthesis. Three PRPS genes have been identified: the widely expressed are PRPS1 and PRPS2 genes, and PRPS3, which is predominantly transcribed only in testis.

Most PRSPs belong to class I, which require Mg^{2+} and phosphate for enzymatic activity, but can be inhibited allosterically by ADP and possibly other nucleotides.

Class II PRSPs are found specifically in plants which are not dependent on phosphate for activity and lack an allosteric site for ADP

While class I PRSPs transfer the diphosphoryl group only from ATP or dATP to ribose 5-phosphate, class II PRSPs have a much broader specificity for a diphosphoryl donor, including ATP, dATP, UTP, CTP and GTP. Recently, a novel class III PRS has been identified from *Methanocaldococcusjannaschii* which is activated by phosphate and uses ATP and dATP as a diphosphoryl donor, but also lacks an allosteric site for ADP.

Mg^{2+} forms a complex with ATP (Mg-ATP) to act as the actual substrate of the enzyme although other divalent cations, such as Mn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} or Cd^{2+} can serve as substitutes for Mg^{2+} with relatively lower activity. Phosphate has multiple effects on the activity and structure of the enzyme. It usually acts as an activator for the activity of bacterial and mammalian PRSPs although SO_4^{2-} can mimic the effect of phosphate at approx. 10-fold higher concentrations.

In patients with PRPS super activity, Roessler et al., and Becker et al. identified mutations in the PRPS-1 gene. All patients except 1 had hyperuricemia, neurodevelopmental abnormalities, and sensorineural deafness; the other patient had only hyperuricemia and gout. Functional expression studies of all mutations showed that enzyme over activity were due to alteration of allosteric feedback mechanisms.

Thus, abnormalities in synthesis of purines might influence on the catabolism of them and induce hyperuricemia and gout. The final enzyme, responsible for the formation of uric acid is Xanthine Oxidoreductase.

Also, it is necessarily to mention, that very little is known about the PRPS-1 in the stroke or experimental stroke conditions.

Xanthine oxidoreductase (XOR; EC. 1.1.3.22) is key and primer enzyme responsible for the formation of the uric acid from xanthine and hypoxanthine.

In our previous publications we stated that regulation of XOR might have an impact on the entire catabolism of the purines. By the utility of XOR inhibitors we demonstrated in our experiments that inhibition of this enzyme might trigger cells genesis in vitro.

XOR and brain ischemia. It is very well documented that after forebrain ischemia/reperfusion it might be generated excessive amount of superoxide anion radicals. Evidence exists that allopurinol, a xanthine-oxidase inhibitor, reduces delayed cell death in animal models of perinatal asphyxia and in human patients with other forms of organ reperfusion injury. Thus, allopurinol pretreatment suppresses generation of superoxide anion radicals, making XO (xanthine oxidase) the main enzyme responsible for the oxidative damage caused after oxidative stress, early inflammation, endothelial injury. By the other group of authors it was demonstrated that XO and cyclooxygenase are mostly responsible for postanoxic damage of the brain. Also, it was demonstrated that hydrogen peroxide damage is mediated through the activity of the XO in cerebellar granule neurons obtained from 8-day old Sprague-Dawley rat pups. By the other work it was shown that superoxide anion generated by the XO as well as singlet oxygen initiated the apoptosis-like cell death whereas hydrogen peroxide, generated because of the activity of the glucose oxidase and glucose deprivation in neuronal cell culture initiated necrosis.

PRPS-1 and XOR after experimental stroke conditions, induced by intracranial injection of hydrogen peroxide.

In accordance to the literature data, allopurinol inhibits the enzyme XOR, thereby blocking the conversion of the oxypurines hypoxanthine and xanthine to uric acid. Allopurinol administration also leads to deceleration of the rate of de novo synthesis of purine nucleotides.

In our own experiments to clarify the behavior of the XOR and PRPS-1 enzymes in the pathological conditions, first, we needed to evaluate their activities in the brain of intact animals.

The activity of the PRPS-1 was diminished in the presence of GTP (inhibitor of PRPS-1) as well as allopurinol, which means that purines catabolism inhibition by feed-back mechanism might inhibit also the activity of PRPS-1.

Interestingly, XOR activity was inhibited by GTP, which might be explained or as the influence of key regulative enzyme PRPS-1 impact on XOR activity or overwhelming concentration of energetic source – GTP.

After comparison of the dynamic changes of XOR and PRPS-1 activities in 3 groups: peroxide intracranial injected animals serving as the control group; phosphate treated animals; allopurinol treated animals in peroxide treated as well as phosphate groups it is notable negative correlation of XOR and PRPS-1 activities. Strong, over activation of the PRPS-1 and simultaneous inhibition of XOR might trigger of purine and pyrimidine nucleotides source generation, which in turn might stimulate cells proliferation.

Also, its necessarily to take into the consideration, that patients with hypoxanthine–guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) deficiency or Lesch-Nyhan disease (MIM 300322) having uric acid overproduction similar to PRPS-1 super activity can also have mental retardation and hypotonia, as described in patients with Arts syndrome .

Thus, the phosphate related elevation of PRPS-1 activity and simultaneous decrease of XOR activity will promote synthesis of purines and will prevent above mentioned negative side effects related with overproduction of uric acid.

In allopurinol treated animals group the negative correlation was not notable.

In contrast to the intact animals brain tissue, GTP didn't activate XOR in pathological condition; exception is the allopurinol treated animals group. Allopurinol after modifications in the organism might by itself possess with the high absorption in the conditions of very low baseline XOR activity.

It might be explained due to the formation of Xanthine Oxidase from Xanthine Dehydrogenase via limited proteolysis, because XOR is the dual enzyme and in pathological conditions act mostly as the oxidase.

Allopurinol in hydrogen peroxide treated animals brain tissue was inhibiting activity of PRPS-1; exception is the allopurinol treated animals group. In pathological conditions, we might assume, that PRPS-1 might be structurally changed and behaves not as in normal, physiological conditions.

References

1. *Arnvig, K., B. Hove-Jensen and R. L. Switzer* (1990). "Purification and properties of phosphoribosyl diphosphate synthetase from *Bacillus subtilis*." *Eur. J. Biochem.* 192: 195-200.
2. *Becker, M. A.* (2001). Hyperuricemia and Gout. In: *Scriver, C. R.; Beaudet, A. L.; Sly, W. S.; Valle, D. (eds.) :The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill.
3. *Becker, M. A., P. R. Smith, W. Taylor, R. Mustafi and R. L. Switzer* (1995). "The genetic and functional basis of purine nucleotide feedback-resistant phosphoribosyl pyrophosphate synthetase superactivity." *J. Clin. Invest.* 96: 2133-2141.
4. *Danielyan, K. E.* (2013). "Dependence of Cells Survival from Xanthine Oxidase and Dihydropyrimidine Dehydrogenase Correlative Activities in Human Brain Derived Cell Culture." *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry* 13(2): 108-113.
5. *Danielyan, K. E.* (2014). "New details regarding XOR as a part of the balanced oxidative and antioxidative systems." *Biological Journal of Armenia* LXVI (1): 30-43.

6. *Danielyan, K. E. and G. A. Kevorkian* "Xanthine oxidase activity regulates human embryonic brain cells growth." *Biopolym. Cell*27(5): 350-353.
7. *de Brouwer, A. P., H. van Bokhoven, S. B. Nabuurs, W. F. Arts, J. Christodoulou and J. Duley* (2010). "PRPS1 mutations: four distinct syndromes and potential treatment." *Am J Hum Genet*86(4): 506-518.
8. *Eriksen, T. A., A. Kadziola, A. K. Bentsen, K. W. Harlow and S. Larsen* (2000). "Structural basis for the function of *Bacillus subtilis* phosphoribosyl-pyrophosphate synthetase." *Nat. Struct. Biol.* 7: 303-308.
9. *Fatokun, A. A., T. W. Stone and R. A. Smith* (2007). "Hydrogen peroxide mediates damage by xanthine and xanthine oxidase in cerebellar granule neuronal cultures." *Neurosci Lett*416(1): 34-38.
10. *Fox, I. H. and W. N. Kelley* (1971). "Human phosphoribosylpyrophosphate synthetase. Distribution, purification, and properties." *J. Biol. Chem.* 246: 5739-5748.
11. *Gibson, K. J., K. R. Schubert and R. L. Switzer* (1982). "Binding of the substrates and the allosteric inhibitor adenosine 5'-diphosphate to phosphoribosyl pyrophosphate synthetase from *Salmonella typhimurium*." *J. Biol. Chem.* 257: 2391-2396.
12. *Gyongyan, S. A., T. G. Manucharyan, K. E. Danielyan, G. A. Kevorkyan and S. G. Chailyan* (2013). "Xanthine oxidoreductase is a key enzyme of purine catabolism regulation." *Electronic Journal of Natural Science*2(21): 17-21.
13. *Hove-Jensen, B.* (1988). "Mutation in the phosphoribosylpyrophosphate synthetase gene (*prs*) that results in simultaneous requirements for purine and pyrimidine nucleosides, nicotinamide nucleotide, histidine and tryptophan in *Escherichia coli*." *J. Bacteriol.*170: 1148-1152.
14. *Hove-Jensen, B.* (1989). "Phosphoribosylpyrophosphate (PRPP)-less mutants of *Escherichia coli*." *Mol. Microbiol.*3: 1487-1492.
15. *Hove-Jensen, B., K. W. Harlow, C. J. King and R. L. Switzer* (1986). "Phosphoribosylpyrophosphate synthetase of *Escherichia coli*. Properties of the purified enzyme and primary structure of the *prs* gene." *J. Biol. Chem.*261: 6765-6771.
16. *Kadziola, A., C. H. Jepsen, E. Johansson, J. McGuire, S. Larsen and B. Hove-Jensen* (2005). "Novel class III phosphoribosyl diphosphate synthase structure and properties of the tetrameric, phosphate-activated, non-allosterically inhibited enzyme from *Methanocaldococcus jannaschii*." *J. Mol. Biol.*354: 815-828.
17. *Krath, B. N., T. A. Eriksen, T. S. Poulsen and B. Hove-Jensen* (1999). "Cloning and sequencing of cDNAs specifying a novel class of phosphoribosyl diphosphate synthase in *Arabidopsis thaliana*." *Biochim. Biophys. Acta.* : 1430:1403-1408.
18. *Krath, B. N. and B. Hove-Jensen* (2001). "Class II recombinant phosphoribosyl diphosphate synthase from spinach. Phosphate independence and diphosphoryl donor specificity." *J. Biol. Chem.* 276: 17851-17856.
19. *Liu, X. Z., D. Xie, H. J. Yuan, A. P. de Brouwe, J. Christodoulou and D. Yan* (2013). "Hearing loss and PRPS1 mutations: Wide spectrum of phenotypes and potential therapy." *Int J Audiol.* 52(1): 23-28.
20. *Meyer, L. J. and M. A. Becker* (1977). "Human erythrocyte phosphoribosylpyrophosphate synthetase. Dependence of activity on state of subunit association." *J. Biol. Chem.*252: 3919-3925.
21. *Mink, R. B., A. J. Dutka and J. M. Hallenbeck* (1991). "Allopurinol pretreatment improves evoked response recovery following global cerebral ischemia in dogs." *Stroke*22: 660-665.
22. *Ono, T., R. Tsuruta, M. Fujita, H. S. Aki, S. Kutsuna, Y. Kawamura, J. Wakatsuki, T. Aoki, C. Kobayashi, S. Kasaoka, I. Maruyama, M. Yuasa and T. Maekawa* (2009). "Xanthine oxidase is one of the major sources of superoxide anion radicals in blood after reperfusion in rats with forebrain ischemia/reperfusion." *Brain Res*1305: 158-167.
23. *Roessler, B. J., J. M. Nosal, P. R. Smith, S. A. Heidler, T. D. Palella, R. L. Switzer and M. A. Becker* (1993). "Human X-linked phosphoribosyl pyrophosphate synthetase superactivity is associated with distinct point mutations in the PRPS1 gene." *J. Biol. Chem.* 268: 26476-26481.
24. *Roessler, B. J., T. D. Palella, S. Heidler and M. A. Becker* (1991). "Identification of distinct PRPS1 mutations in two patients with X-linked phosphoribosyl pyrophosphate synthetase superactivity. (Abstract)." *Clin. Res.* 39: 267A.

-
25. Roth, D. G. and T. F. Deuel (1974). "Stability and regulation of phosphoribosyl pyrophosphate synthetase from rat liver." J. Biol. Chem.249: 297-301.
 26. Roth, D. G., E. Shelton and T. F. Deuel (1974). "Purification and properties of phosphoribosyl pyrophosphate synthetase from rat liver." J. Biol. Chem.249: 291-296.
 27. Switzer, R. L. (1969). "Regulation and mechanism of phosphoribosyl pyrophosphate synthetase. I. Purification and properties of the enzyme from Salmonella typhimurium." J. Biol. Chem.244: 2854-2863.
 28. Switzer, R. L. and D. C. Sogin (1973). "Regulation and mechanism of phosphoribosyl pyrophosphate synthetase. V. Inhibition by end products and regulation by adenosine diphosphate." J. Biol. Chem.248: 1063-1073.
 29. Valencia, A. and J. Morán (2004). "Reactive oxygen species induce different cell death mechanisms in cultured neurons." Free Radic Biol Med36(9): 1112-1125.
 30. Widmer, R., M. Engels, P. Voss and T. Grune (2007). "Postanoxic damage of microglial cells is mediated by xanthine oxidase and cyclooxygenase." Free Radic Res41(2): 145-152.
 31. Willemoes, M. and B. Hove-Jensen (1997). "Binding of divalent magnesium by Escherichia coli phosphoribosyl diphosphate synthetase." Biochemistry36: 5078-5083.

Biolog. Journal of Armenia, 1 (69), 2017

INSIGHTS ON GLUCOCORTICOID RECEPTOR MODULATION THROUGH BINDING OF ARTEMISININ

S.V. GINOSYAN¹, H.V. GRABSKI¹, S.G. TIRATSUYAN^{2,1}

¹Russian-Armenian University, ²Yerevan State University

E-mail: siranush.ginosian.93@mail.ru; hovakim_grabski@outlook.com; stiratsuyan@bk.ru;

In this work *in silico* study of the interaction of artemisinin with ligand bind domain of glucocorticoid receptor by molecular modeling methods. Artemisinins belong to the family of sesquiterpene lactones, secondary metabolites of medicinal plant *Artemisia annua*, which has been traditionally used in Chinese medicine. Artemisinins exhibit antioxidant, anti-inflammatory, anti-carcinogenic and other activities. Molecular docking, principal component analysis, cluster analysis have revealed three binding sites of artemisinin with ligand bind domain of glucocorticoid receptor which are very important regions. Comparative analysis was performed with dexamethasone, which is a corticosteroid medication. Thus, we have shown for the first time that artemisinin affects extremely important sites of ligand bind domain of glucocorticoid receptor, it should be noted that the first binding site of artemisinin corresponds to the interaction site of dexamethasone. This may represent a molecular basis for ligand-dependent receptor activation and the possibility of using artemisinin as a new ligand for glucocorticoid receptor.

Glucorticoid receptor – artemisinin – dexamethasone - molecular docking – cluster analysis

В данной работе изучено *insilico* взаимодействие артемизинина с лиганд связывающим доменом глюкокортикоидного рецептора методами молекулярного моделирования. Артемизинины относятся к семейству сесквитерпеновых лактонов, вторичных метаболитов лекарственного растения *Artemisiaannua*, которое традиционно используется в китайской медицине. Артемизинины проявляют антиоксидантную, противовоспалительную, антиканцерогенную и др. активности. Методами молекулярного докинга, анализа по главным компонентам и кластерного анализа выявлено три сайта связывания артемизинина с лиганд связывающим доменом глюкокортикоидного рецептора, которые являются чрезвычайно важными участками. Проведен сравнительный анализ с кортикостероидным препаратом дексаметазоном. Нами впервые показано, что артемизинин влияет на чрезвычайно важные участки лиганд связывающим доменом глюкокортикоидного рецептора, при этом первый сайт связывания артемизинина соответствует сайту взаимодействия дексаметазона. Это может представлять молекуляр-

ную основу для лиганд-зависимой активации рецептора и рассмотрения возможности использования артемизинина в качестве нового лиганда для этого рецептора.

Глюкокортикоидный рецептор – артемизинин – дексаметазон – молекулярный докинг – кластерный анализ

Այս աշխատանքում իրականացված է արտեմիզինինի և գլյուկոկորտիկոիդային ընկալիչի լիգանդ կապող դոմենի փոխադրեցության ուսումնասիրություն *insilico* մոլեկուլային մոդելավորման մեթոդների միջոցով: Արտեմիզինինները պատկանում են սեսքվիթերպենային լակտոնների ընտանիքին, հանդիսանալով *Artemisia annua* դեղաբույսերի երկրորդային մետաբոլիտ, որն ավանդաբար օգտագործվում է չինական բժշկության մեջ: Արտեմիզինինները ցուցաբերում են հակաօքսիդանտային, հակաբորբոքային, հակաբաղկեղածին և այլ ակտիվություններ: Մոլեկուլային դոքինգի, հիմնական բաղադրիչների վերլուծության, կլաստերային վերլուծության միջոցով հայտնաբերվել է արտեմիզինինի և գլյուկոկորտիկոիդային ընկալիչի լիգանդկապող դոմենի միջև կապման երեք կայք, որոնց չափազանց կարևոր են: Կատարվել է համեմատական վերլուծություն դեքսամետազոնի որպես կորտիկոսթերոիդային դեղանյութի հետ: Այսպիսով, առաջին անգամ ցույց է տրվել, որ արտեմիզինը փոխադրում է գլյուկոկորտիկոիդային ընկալիչի լիգանդկապող դոմենի հետ չափազանց կարևոր կայքերի հետ, ընդ որում նրա առաջին կայքը համապատասխանում է դեքսամետազոնի փոխադրեցության կայքի հետ: Սա կարող է մոլեկուլային հիմք հանդիսանալ լիգանդից կախված ընկալիչի ակտիվացման և արտեմիզինի դիտարկման հնարավորությանը որպես նոր լիգանդ:

Գլյուկոկորտիկոիդային ընկալիչ – արտեմիզինին – դեքսամետազոն – մոլեկուլային դոքինգ – կլաստերային վերլուծություն

Artemisinins, secondary metabolites of medicinal plants *Artemisia annua* belong to the family of sesquiterpene trioxane lactones, traditionally used in Chinese medicine [1, 6]. Artemisinins exhibit a wide range of biological activities, such as antioxidant, anti-inflammatory, anti-carcinogenic, immunomodulating, antimicrobial, anti-amyloidogenic anthelmintic, antiviral, etc. [8, 19]. Artemisinins may contribute to formation of free radicals, modulate multiple signaling pathways, including TLR, Syk tyrosine kinase, phospholipase C, phosphatidylinositol-3 kinase / protein kinase C cascade, mitogen-activated protein kinases, β -catenins [11, 8], and also the transcriptional factors STAT-1/3/5, NF- κ B, Sp1 and Nrf2 / ARE, as well as NR3. In vitro studies in human hepatocytes revealed the activation of the constitutive androstan receptor (CAR, NR1H3) [5] the main mechanism of artemisinin mediated induction of CYP3A4, CYP2B6, and ABCB1 [18]. However, the exact mechanisms of action or molecular targets are not well studied. There is a major task for the identification of molecular targets for artemisinin. Preliminary *in silico* screening using TargetNet [23] showed that the optimal target for artemisinin is the ligand-binding domain of the glucocorticoid receptor (LBD GR). Steroid receptors including human glucocorticoid (hGR) play a vital role in the maintenance of numerous functions such as metabolic and homeostatic regulation through the interaction with glucocorticoids [16, 20]. Glucocorticoids are known to play a significant role in orchestrating cell-cell communication, which is necessary for the coordination of development, growth, metabolism, immunity and used extensively for inflammatory disorders [7, 14]. However, this is a double-edged sword approach with beneficial therapeutic actions alongside serious adverse effects [22]. It should be noted that a lot of modern research has been focused on the development of novel compounds such as selective glucocorticoid receptor agonists or selective glucocorticoid receptor modulators, that can be used as anti-inflammatory drugs.

In silico study was performed for the identification of binding sites of artemisinin with human glucocorticoid receptor and comparative analysis with common used drug Dexamethasone (9-fluoro-11 β ,17,21-trihydroxy-16 α methylpregna-1,4-diene-3,20-dione).

Materials and methods

LBD of hGR was selected from the Brookhaven (RCSB) Protein Data Bank (PDB) [3]. In order to validate the accuracy of the obtained results, co-crystallized dexamethasone ligand was extracted from the LBD of hGR and performed blind docking. To build the hGr–

ligand complex, using Autodock Vina [21]. 100 docking runs were performed. Principal component (PC) [12] and cluster analysis using K-means algorithm [10] was performed on docking results. Cluster quality was assessed using Davies–Bouldin Index (DBI), Silhouette Score, Dunn Index and the pseudo-F statistic (pSF or Calinski Harabasz) [2]. The root-square-mean-deviation (RMSD) was calculated using MDTraj library [13]. The RMSD between the predicted conformation and the observed X-ray crystallographic conformation was then determined. Maps of hydrophobic and hydrophilic interactions for artemisinin and dexamethasone with hGR were also generated. Ligplot was used for the identification of interaction modes of artemisinin [23]. 3D visualization was done using Pymol [9].

Results and discussion

The docking procedure accuracy was assessed by examining how closely the centroid [13] pose extracted from 100 runs (binding conformation) by re-docking of co-crystallized ligand 9-fluoro-11b,17,21-trihydroxy-16a-methylpregna-1,4-diene-3,20-dione (dexamethasone) resembles the binding mode obtained by X-ray crystallography. The RMSD value between the two superimposed poses of dexamethasone co-crystallized ligand, bound to hGR (PDB ID: 4UDC) and its conformation obtained after re-docking was 0.5 Å (Fig.1). The RMSD value for the predicted pose is less than 2.0 Å, which indicates that the prediction is of good quality [21].

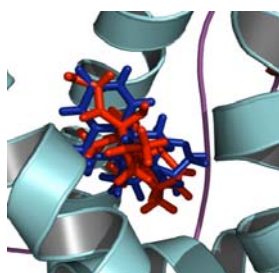


Figure 1. Superimposition of docked poses of dexamethasone (blue) with its crystallographic structure (red) conformation (RMSD: 0.5 Å).

Principal component analysis and cluster analysis using k-means demonstrated that there are three binding sites of artemisinin to LBD GR. The first binding site (cluster) contained 65% of docked poses with the highest binding affinity ($-7,069 \pm 0,479$ kcal/mol). An optimal number of clusters were chosen, simultaneously accounting for a low DBI, High Silhouette, High Dunn Index and high pSF values [2].

Comparative analysis of the interaction of artemisinin and dexamethasone demonstrated that the first binding site of artemisinin matches the interaction site of dexamethasone with LBD hGR. (Fig 2 a, b).

Dexamethasone forms 3 hydrogen bonds with hGR between (Figure 3, Figure 4b) Leu 563, Gln 570 and Thr 739 residues. It should be noted that dexamethasone forms hydrogen bonds, while artemisinin does not. Artemisinin interacts hydrophobically with Asn564, Gln642 и Tyr735 (Figure 3)

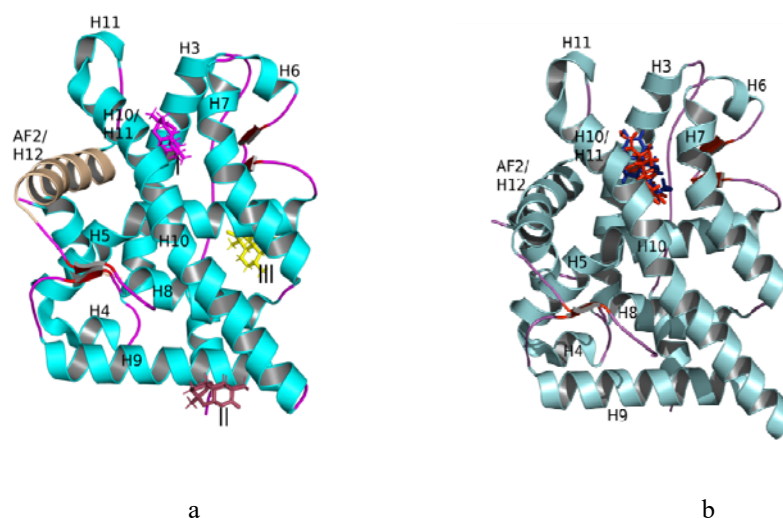


Figure 2.a) Binding mode of artemisinin in the catalytic pocket of hGR (PDB ID: 4UDC): I, II and III – binding sites .b) Superimposition of docked pose of Dexamethasone with its crystallographic structure (RMSD: 0.5 Å)

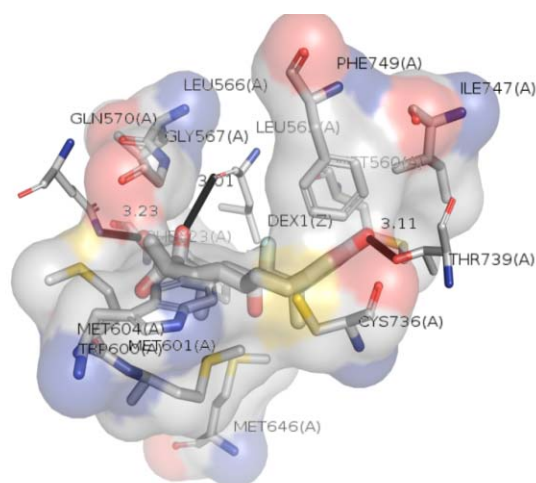


Figure 3. Putative Hydrogen bonds (black line) formed between Dexamethasone with LBD of hGR (PDB ID: 4UDC).

The hydrophobic interaction analysis of the first binding site demonstrated (fig 2a) that A, B, C и D rings of Artemisinin interact with α – helices H3, H7, H10/H11 and β A-sheets of LBD GR. Aminoacids of H3 and β A play an important role during dimerization of LBD GR and aminoacids of H5 - dimer stabilization [4]. Aminoacids of H3-H7 (550-653a.a) are responsible for the binding with chaperone Hsp90[15], and H3, H5 и H12 - co-activator NcoA-2 binding site [23]. In the second binding site A,C,D rings of artemisinin interact hydrophobically with the aminoacids of H9 and H10 and in the third – H1,H5 and H8 with A,B,D rings. Aminoacids of Glu542, Val543(H1, H5) are responsible for the dimerization stabilization of LBD hGR[17] Artemisin interaction interacts hydrophobically with the aminoacids of the first binding site: Met560, Leu563, Phe623, Met646, Leu732, Ile747, Phe749, Arg611, 3rd binding site like dexamethasone.

All glucocorticoids interact with ligands including dexamethasone through Gln642, while Tyr735 plays an important role during ligand interpretation and receptor transactivation. The interactions with these amino acids play a critical role for conformation changes of the receptor. Both artemisinin and dexamethasone interact with Ile747 and Phe749 of the loop that is located before AF- 2 helix. These interactions provide the stabilization of AF-2 during its active state as well as the dimerization of LBD GR. This presents a molecular basis for ligand dependent activation of GR [4]. Comparative analysis of the first binding site of artemisinin with LBD GR with dexamethasone demonstrated that have common amino acids that participate during the interaction. Each ligand has its own peculiar interaction with other amino acids, which can explain GR conformation changes and this can promote the formation of alternative protein surface and affect co-regulator binding.

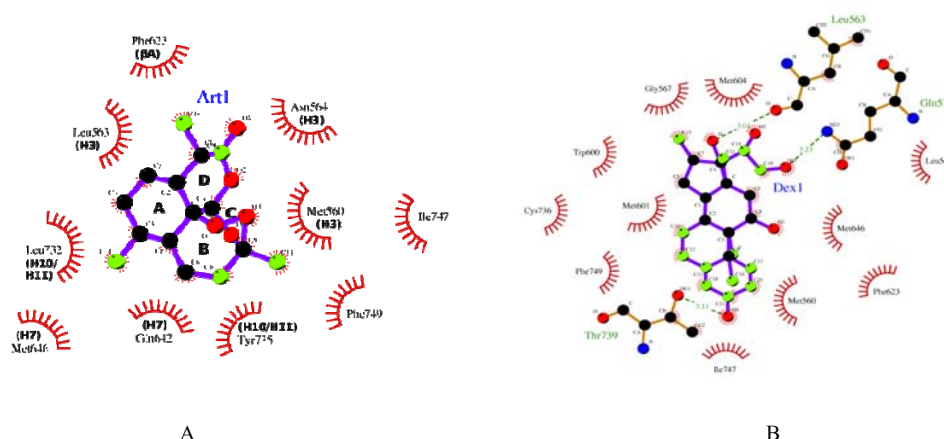


Figure 4. Binding mode of the 1-st cluster artemisinin (PDB ID: 4UDC) (a) and dexamethasone (b) in the catalytic pocket of hGR.

In this study we have shown for the first time that artemisinin affects extremely important sites of LBD GR, it should be noted that the first binding site of artemisinin corresponds to the interaction site of dexamethasone. This may represent a molecular basis for ligand-dependent receptor activation and the possibility of using artemisinin as a new ligand for GR.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grant NIR 25/15 of the Russian-Armenian University.

References

1. Коновалов Д. А., Хамилонов А. А. Биологически активные соединения полыни однолетней. Эфирное масло. Фармация и фармакология, 2016.
2. Сивоголовко Е. В. Методы оценки качества четкой кластеризации. Компьютерные инструменты в образовании. 4, 96с, 2011.
3. Berman, H., Westbrook, J., Feng, Z., et al. The protein data bank. Nucleic acids research, 28,1, 235-242, 2000.
4. Bledsoe R., Montana V., Stanley T., etc., Crystal structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition. Cell.110.1. p. 93-105. 2002.
5. Burk O, Piedade R., Ghebreghiorgis L., et al., Differential effects of clinically used derivatives and metabolites of artemisinin in the activation of constitutive androstane receptor isoforms British Journal of Pharmacology.167, 666–681, 2012.

6. Chougouo R. *et al.* Anti-inflammatory and acetylcholinesterase activity of extract, fractions and five compounds isolated from the leaves and twigs of *Artemisia annua* growing in Cameroon. *Springer Plus*. 5,1 c, 1525, 2016.
7. Cruz-Topete D. & Cidlowski J. One Hormone Two Actions: Anti- and Pro-inflammatory Effects of Glucocorticoids, *Neuroimmunomodulation*. 22,0,20–32, 2015.
8. Dai Y., Zhou W., Meng J., *etc.* The pharmacological activities and mechanisms of artemisinin and its derivatives: a systematic review . *Medicinal Chemistry Research*. 26, 5, p. 867-880, 2017.
9. DeLano W. L. The PyMOL Molecular Graphics System. De-Lano Scientific, San Carlos, CA, USA .<http://www.pymol.org>, 2002.
10. Hartigan, J., & Wong M. "Algorithm AS 136: A k-means clustering algorithm." *Journal of the Royal Statistical Society. Series C (Applied Statistics)* 28, 1, 100-108, 1979.
11. Ho *et al.* Artemisinins: pharmacological actions beyond anti-malarial. *Pharmacology & therapeutics*.142,1, c.126-139, 2014.
12. Jolliffe, I. Principal component analysis. John Wiley & Sons, Ltd, 2002.
13. McGibbon, R., Beauchamp, K., Harrigan M., *et al.* MDTraj: A modern open library for the analysis of molecular dynamics trajectories. *Biophys. Journal*.109, 8,1528-1532, 2015.
14. Presman D., Hager G. More than meets the dimer: What is the quaternary structure of the glucocorticoid receptor? .*Transcription*. 8,1, c 32-39, 2017.
15. Ratajczak T., Allan R., Chuning C., & Ward B. Functional Protein Interactions in Steroid Receptor-Chaperone Complexes. *Protein Interactions*. – InTech, 2012.
16. Ratman D, Mylka V, Bougarne N, *etc.* Chromatin recruitment of activated AMPK drives fasting response genes co-controlled by GR and PPAR_ *Nucleic Acids Research*. 44, 22, 10539–10553, 2016.
17. Reyher H., Ponsuksili S., Kanitz E., *et al.* A Natural Mutation in Helix 5 of the Ligand Binding Domain of Glucocorticoid Receptor Enhances Receptor-Ligand Interaction. *PloS one*. 11,10, e0164628, 2016
18. Sangkuhl K, Artemisinin and Derivatives Pathway, *Pharmacokinetics, Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 92, 4, 414-417, 2012.
19. Shi J., Zhang C., Sun X., *et al.* Antimalarial Drug Artemisinin Extenuates Amyloidogenesis and Neuroinflammation in APPswe/PS1dE9 Transgenic Mice via Inhibition of Nuclear Factor- κ B and NLRP3 Inflammasome Activation. *CNS neuroscience & therapeutics*. 19, 4, p. 262-268, 2013.
20. Sundahl N., Bridelance J. *et al.* Selective glucocorticoid receptor modulation: New directions with non-steroidal scaffolds .*Pharmacology & therapeutics*.152, p.28-41, 2015.
21. Trott O., Olson A. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*. 31, 2, c. 455-461. 2010.
22. Wallace A., Laskowski R., Thornton J. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein engineering*. 8, 2, c.127-134, 1995.
23. Weikum E, Matthew T. Knuesel, E. *etc.*, Glucocorticoid receptor control of transcription: precision and plasticity via allostery *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 18,159–174, 2017.
24. Yao Z., Dong J., Che Y., *et al.*, TargetNet: a web service for predicting potential drug–target interaction profiling via multi-target SAR models. *Journal of computer-aided molecular design*. 30, 5, p. 413-424, 2016.
25. Zhou W., Meng J., Du X., *et al.* The pharmacological activities and mechanisms of artemisinin and its derivatives: a systematic review. *Medicinal Chemistry Research*. 26, 5, p. 867-880, 2017.

BIO-HYDROGEN PRODUCTION BY *RHODOBACTER SPHAEROIDES* DURING MIXED CARBON FERMENTATION

L.Y. HAKOBYAN¹, L.S. GABRIELIAN^{1,2}, A.H. TRCHOUNIAN^{1,2}

Yerevan State University, 1 Research Institute of Biology
; 2 Department of Biochemistry, Microbiology and Biotechnology,
lilit_hy@ysu.am

Bio-hydrogen (H_2) production is considered as one of the promising ways to generate ecologically clean and renewable energy from various cheap and effective carbon sources like glycerol or industrial wastes. Experiments were carried out to reveal the H_2 production by Rhodo bacter sphaeroides MDC6521 during mixed carbon (succinate, glucose and glycerol) fermentation and the input of the F_0F_1 -ATPase in this process. The results show that bacteria grown in a medium containing glucose and glycerol (15 mM) in addition to succinate (15 mM), exhibit an increase not only in H_2 production, but also in F_0F_1 -ATPase activity of membrane vesicles obtained from them. Significant ~1.7 fold increase of DCCD sensitive ATPase activity was obtained with glycerol addition compared with control (30 mM succinate), and since it had a positive effect also on H_2 yield, further experiments will be performed to obtain the optimal succinate/glycerol ratio to get the maximum H_2 yield.

Bio-hydrogen production–Rhodo bacter sphaeroides - mixed carbon fermentation

Կենսաջրածնի (H_2) արտադրությունը համարվում է էկոլոգիապես մաքուր և վերարտադրող էներգիայի ստացման խոստումնալից ուղի՝ բազմաթիվ էժանև արդյունավետ ածխածնի աղբյուրների (գլիցերին, արդյունաբերական թափոններ) կիրառման հնարավորությամբ: Փորձերի նպատակն է եղել բացահայտել *Rhodobacter sphaeroides* MDC6521-ի կողմից H_2 -ի արտադրության առանձնահատկությունները խառը ածխածնային (սուկցինատ, գլյուկոզ և գլիցերին) խմորման պայմաններում և F_0F_1 -ԱՖՖազի ներդրումը այդ գործընթացում: Արդյունքները ցույց են տվել, որ սուկցինատից (15 մՄ) բացի նաև գլյուկոզ (15 մՄ) և գլիցերին (15 մՄ) պարունակող միջավայրում աճած բակտերիաները դրսևորում են ոչ միայն H_2 -ի արտադրության, այլև նաև թաղանթային բջիջների F_0F_1 -ԱՖՖազի ակտիվության խթանում: ԴՅԿԴ-զգայուն F_0F_1 -ԱՖՖազի ակտիվության զգալի՝ ~1.7 անգամ աճ է գրանցվել սուկցինատի և գլիցերինի (15-ական մՄ) խառնուրդում ստուգիչի (30 մՄ սուկցինատ) համեմատությամբ, և բանի որ այն ուներ դրական ազդեցություն նաև H_2 -ի ելքի վրա, հետագա ուսումնասիրություններ կիրականացվեն՝ ստանալու առավելագույն H_2 -ի ելք ապահովող սուկցինատ/գլիցերին հարաբերությունը:

Կենսաջրածնի արտադրություն–*R. sphaeroides*–խառը ածխածնային խմորում

Производство биоводорода (H_2) считается перспективным способом получения чистой и возобновляемой энергии из различных дешевых и эффективных источников углерода, таких как глицерин или промышленные отходы. Были проведены исследования для выявления особенностей выделения H_2 бактерией *Rhodobacter sphaeroides* MDC6521 при сбраживании смешанных источников углеродов (сукцинат, глюкоза и глицерин) и роли F_0F_1 -АТФазы в этом процессе. Результаты показывают, что бактерии, выращенные в среде, содержащей глюкозу и глицерин (15 мМ) в дополнение к сукцинату (15 мМ), демонстрируют увеличение не только выхода H_2 , но также АТФазной активности мембранных везикул. При добавлении глицерина ДЦКД-чувствительная АТФазная активность увеличивалась в ~1.7 раз по сравнению с контролем (30 мМ сукцинат). Так как добавление глицерина положительно сказывалось и на выделении H_2 бактерией, будут проведены дальнейшие исследования для получения оптимального соотношения сукцинат/глицерин, обеспечивающего максимальный выход H_2 .

Производство биоводорода –*Rhodo bacter sphaeroides*–сбраживание смешанных источников углеродов

H₂ is an energy carrier with high energy content (–122 kJg^{–1}). It is recognized as the most promising alternative to fossil fuels as it is clean, renewable, and efficient [1,10]. Biological H₂ production with microorganisms is considered as more perspective way of H₂ production at an industrial scale, not only compared to chemical production, but also compared to other biotechnological methods, due to a variety of substrates and organic wastes the microorganisms can use [7,11]. Photosynthetic purple non-sulfur bacteria such as *Rhodobacter* species are promising candidates for the H₂ production due to their high substrates conversion rate [3,6]. Under anaerobic conditions *Rhodobacter sphaeroides*, isolated from Armenian mineral springs, has been shown to perform a photo-fermentation of various carbon- and nitrogen-containing organic substrates with H₂ production [2,4,5]. The selection of the source for H₂ is a serious problem, because it strongly affects the H₂ yield by photosynthetic bacteria. The source should be relatively inexpensive and be effectively utilized by bacteria resulting in high H₂ yield. Various organic substrates, generally used in laboratory for research on H₂ production have been used in our research previously, providing a fast and efficient H₂ production [3,6]. But one of the key problems was always high cost of various organic carbon and nitrogen sources. A key to the solution of this problem can be the use of different organic wastes, which are cheaper and more effective for H₂ production and can provide inexpensive energy generation and simultaneous waste utilization [9]. The promising results obtained by our group for H₂ production during substrate utilization led to number of questions regarding the mechanisms of this process. The analysis of pathways of H₂ production during substrate utilization is difficult due to a complex composition of industrial wastes. One way to address this issue can be analysis of H₂ production process during a mixed carbon fermentation using a limited number of carbon sources [8].

Materials and method

Phototrophic bacterium *R. sphaeroides* strain MDC6521 (Microbial Depository Center, National Academy of Sciences of Armenia, Yerevan, Armenia, WDCM803), isolated from Arzni mineral spring in Armenian mountains, was cultivated in glass vessels of 150 ml capacities with plastic press caps in anaerobic conditions on Ormerod medium with different carbon sources upon illumination (~36 W m^{–2}) as described previously [2-5,9]. The growth of batch culture was monitored by changes in optical density (OD) by Spectro UV-Vis Auto spectrophotometer (Labomed, USA). Specific growth rate was calculated as ln2/doubling time of OD within a logarithmic growth phase, and it was expressed as h^{–1} [2-5]. The medium E_h was determined during *R. sphaeroides* anaerobic growth by potentiometric method using a pair of redox electrodes: platinum (Pt) and titanium-silicate (Ti-Si) electrodes [2-5]. The H₂ yield was calculated by the decrease of E_h to low negative values during bacterial growth and expressed in mmol/L [2-5]. ATPase activity of *R. sphaeroides* membrane vesicles was estimated by the liberation of inorganic phosphate (P_{in}) in the reaction with ATP by the method of Taussky and Shorr [2-5]. Various reagents of analytical grade were used in this study. Each experiment was repeated three times to determine deviation, which is presented as error bars on the figures.

Results and discussion

The growth was monitored during *R. sphaeroides* cultivation in media containing different carbon source combinations. The results were compared with the control, which contained 30 mM succinate as a carbon source. Bacteria grown under mixed carbon fermentation conditions exhibited slight increase of specific growth rate, compared with control (Fig. 1).

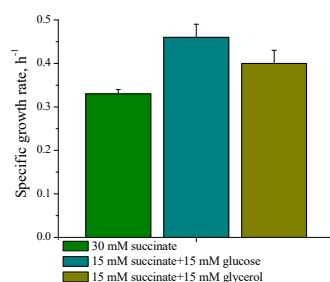


Fig. 1. Specific growth rate of *R. sphaeroides* MDC6521 during mixed carbon fermentation.

As for the H₂ production, during mixed carbon fermentation conditions, the change was significant in case of glycerol, but not the glucose addition (Table 1). There was a ~2.3 fold increase of H₂ yield after 72 hours of growth, compared with control. Since, such an increase in H₂ yield couldn't be explained by bacterial growth enhancement only, membrane associated systems should be examined to find out the possible causes.

Table 1. The effect of mixed carbon fermentation on H₂ yield of *R. sphaeroides* MDC6521.

H ₂ yield, mmol/L (72 hours of growth)	
Control (30 mM succinate)	2.2 ± 0.1
15 mM succinate + 15 mM glucose	2.12 ± 0.1
15 mM succinate + 15 mM glycerol	5.06 ± 0.2

Consequently, we have analyzed effect of mixed carbon fermentation on DCCD-inhibited F₀F₁-ATPase activity of *R. sphaeroides* MDC6521 membrane vesicles. The results show that bacteria grown in a medium containing glucose and glycerol (15 mM) in addition to succinate (15 mM), exhibit an increased F₀F₁-ATPase activity of membrane vesicles obtained from them (Fig. 2).

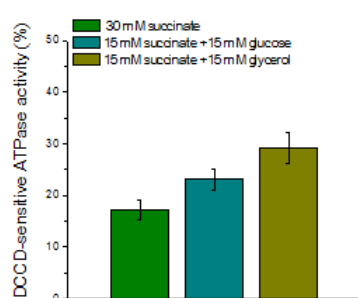


Fig.2. DCCD-sensitive ATPase activity of membrane vesicles of *R. sphaeroides* MDC6521 during mixed carbon fermentation.

Significant ~1.7 fold increase of DCCD sensitive ATPase activity was obtained with glycerol addition compared with control (30 mM succinate). Since it had a positive effect both on bacterial growth and H₂ production, further experiments will be performed to obtain the optimal succinate/glycerol ratio to get the maximum H₂ yield. The role of F₀F₁-ATPase in bioenergetics of *R. sphaeroides* during mixed carbon fermentation can also be considered

in application in biotechnology as a tool to interfere the hydrogen metabolism in these bacteria.

References

1. Basak N, Jana AK, Das D, Saiki D. Photofermentative molecular biohydrogen production by purple-non-sulfur (PNS) bacteria in various modes: The present progress and future perspective. *Int J Hydrogen Energy* 2014;39:6853–71.
2. Gabrielyan L, Sargsyan H, Hakobyan L, Trchounian A. Regulation of hydrogen photoproduction in *Rhodobactersphaeroides* batch culture by external oxidizers and reducers. *Appl Energy* 2014; 131: 20–25.
3. Gabrielyan L, Trchounian A. Purple bacteria and cyanobacteria as potential producers of molecular hydrogen: an electrochemical and bioenergetic approach. In: Trchounian A, editor. *Bacterial Membranes. Ultrastructure, bioelectrochemistry, bioenergetics and biophysics*, Kerala, India: Research Signpost; 2009, p. 233–273.
4. Hakobyan L, Gabrielyan L, Trchounian A. Bio-hydrogen production and the F_0F_1 -ATPase activity of *Rhodobacter sphaeroides*: effects of various heavy metal ions. *Int J Hydrogen Energy* 2012; 37: 17794–17800.
5. Hakobyan L, Gabrielyan L, Trchounian A. Yeast extract as an effective nitrogen source stimulating cell growth and enhancing hydrogen photoproduction by *Rhodobacter sphaeroides* strains from mineral springs. *Int J Hydrogen Energy* 2012; 37: 6519–6526.
6. Han H, Liu B, Yang H, Shen J. Effect of carbon sources on the photobiological production of hydrogen using *Rhodobactersphaeroides* RV. *Int J Hydrogen Energy* 2012; 37: 12167–74.
7. Marone A, Izzo G, Mentuccia L, Massini G, Paganin P, Rosa S, Varrone C, Signorini A. Vegetable waste as substrate and source of suitable microflora for bio-hydrogen production. *Renewable Energy* 2014; 68: 6–13.
8. Rollina JA, del Campoa JM, Myunga S et al. High-yield hydrogen production from biomass by in vitro metabolic engineering: Mixed sugars co-utilization and kinetic modeling. *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 2015; 112: 4964–4969.
9. Sargsyan H, Gabrielyan L, Trchounian A. The distillers grains with solubles as a perspective substrate for obtaining biomass and producing bio-hydrogen by *Rhodobacter sphaeroides*. *Biomass & Bioenergy* 2016; 90, 90–94.
10. Trchounian A. Mechanisms for hydrogen production by different bacteria during mixed-acid and photo-fermentation and perspectives of hydrogen production biotechnology. *Crit Rev Biotechnol* 2015; 35: 103–13.
11. Wang LJ. Production of bioenergy and bioproducts from food processing wastes: a review. *Transactions of the ASABE* 2013; 56: 217–30.

Biolog. Journal of Armenia, 1 (69), 2017

THE CONTENT OF SULFUR DIOXIDE IN DRIED VINE FRUIT REALISED IN ARMENIA

L.L. HAKOBYAN¹, K.M. GRIGORYAN², A.H. TRCHOUNIAN^{1,2}

¹ Department of Biochemistry, Microbiology and Biotechnology, Yerevan State University;

² Research Institute of Biology, Yerevan State University
hakobyanl@ysu.am

In dried vine fruit production much attention is paid to the development of technologies and methods for inhibition the growth and evolution of potentially toxigenic fungi. The most effective method to limit the fungi growth is the treatment of raw grape with sulfur dioxide. However, the

usage of SO₂ is limited by international sanitary regulations. The purpose of this work is to identify the correlation between sulfur dioxide content and the contamination degree of dried vine fruits by filamentous fungi, as well as to determine if the quantity of sulfur dioxide in dried vine fruits sold in Armenia meets the requirements presented in international sanitary rules and regulations.

Sulfur dioxide – dried vine fruit – grape – filamentous fungi

Չորացրած խաղողի արտադրության մեջ մեծ ուշադրություն է դարձվում պոտենցիալ թու-
նածին միգելիալ սնկերի աճը և զարգացումը արգելակող տեխնոլոգիաներին և մեթոդներին: Սնկերի
աճի սահմանափակման ամենարդյունավետ մեթոդն է հումքային խաղողի մշակումը ծծմբի երկօք-
սիդով (SO₂): Սակայն SO₂-ի կիրառումը սահմանափակված է միջազգային սանիտարական կանո-
նակարգերով: Այս աշխատանքի նպատակն է՝ որոշել SO₂-ի պարունակության և միգելիալ սնկերով
չորացրած խաղողի աղտոտվածության աստիճանի միջև կապը, ինչպես նաև բացահայտել թե Յա-
յաստանում իրացվող չորացրած խաղողում SO₂-ի պարունակությունը որքանով է համապատաս-
խանում միջազգային սանիտարական կանոններին և նորմերին:

Ծծմբի երկօքսիդ – չորացրած խաղող – խաղող – միգելիալ սնկեր

В производстве сушеного винограда большое внимание уделяется технологиям и ме-
тодам ингибирования роста и развития потенциально токсигенных грибов. Самым эффек-
тивным методом для лимитирования роста грибов является обработка сырьевого винограда
диоксидом серы. Однако, использование SO₂ лимитировано международным санитарным
законодательством. Целью настоящей работы является выявление корреляции между
содержанием диоксида серы и степенью контаминации сушеного винограда мицелиальными
грибами; а также определение соответствия международным санитарным правилам и нормам
количества диоксида серы в сушеном винограде реализуемом в Армении.

Диоксид серы – сушеный виноград – виноград – мицелиальные грибы

Favorable climatic conditions in countries with well-developed viticulture contribute
to the spreading of mold fungi potential producers of ochratoxin A (OTA). As a result of
mycological analyzes carried out by many authors in different countries OTA was
frequently detected in grapes and grape derived products, especially in different types of
dried vine fruits [1, 2, 9, 10]. In order to reduce the risks of contamination of the final
product during dried vine fruit production much attention is paid to the development of
technologies and methods for inhibition the growth and evolution of mycotoxigenic
filamentous fungi. The use of appropriate agrotechnical means and fungicides in grape
cultivation can significantly prevent the growth of fungi and contamination of final product
by toxigenic species [6]. In post harvest period, the most effective method for limiting the
development of mold fungi is the treatment of raw grape with sulfur dioxide [8].

Sulfur dioxide (SO₂) is used in both gas state and powder form of its sulphite,
bisulphite and metabisulphite salts. These compounds are considered relatively strong
preservatives because of their strong antimicrobial activity. It also acts as an antioxidant
that prevents oxidative processes, which results in a discoloration of final product [3].
Some sultana and raisin types of grape are treated with sulfur dioxide for getting a lighter
and golden color [7]. Sulfitation of row materials is usually carried out by gas fumigation
or immersion in 2-3% sulfuric acid solution. In Armenia dry sulfitation is widely accepted.

However, it was reported that the residual amount of sulfur dioxide can have a
dangerous effect on the health of consumer. Food intake with sulfite content, according to
Settipane [16], caused acute allergic reactions in humans and anaphylactic shock with a
fatal outcome. It is also known about dangerous effect of SO₂ on asthmatic patients [18].
SO₂ and sulfites greatly reduce the absorption of vitamin B1 in human organism, which can
lead to a number of health problems, such as chronic headaches and impairment of
memory. The residual amount of SO₂ in the grapes and in the products of its processing
should not exceed the limit of 1500 mg / kg, established by the Codex Alimentarius [4].

The purpose of this work is to identify the correlation between sulfur dioxide content
and the contamination degree of dried vine fruits by filamentous fungi, as well as to

determine if the quantity of sulfur dioxide in different varieties of dried vine fruits sold in Armenia meets the requirements presented in international sanitary rules and regulations.

Materials and methods

Mycological analyses of dried vine fruit samples were carried out with direct planting and serial dilution planting methods [12]. The dilution includes following steps: 1) shaking the product suspension for 15 minutes on a shaker; 2) infusion for 10 minutes; 3) preparation of serial dilutions 1:10 and 1: 100; 4) surface plating from dilutions on nutrient mediums. Plates were incubated at 25±1 °C for 7 days. Following nutrient mediums were used: CYA (Chapek-Yeast Agar medium, HiMedia Ltd.), GYA (Glucose-Yeast Agar medium, HiMedia Ltd.), and MEA (Malt-Extract Agar medium, HiMedia Ltd.).

The quantity of microscopic fungi in 1 g food was detected according to NF ISO 7698-91 [5]:

$$\omega = \frac{\sum C}{(n_1 + 0.1 n_2)d}$$

$\sum C$ –sum of colonies of fungi grown in all dishes; d – dilution coefficient;

n_1 – number of dishes used for I dilution; n_2 – number of dishes used for II dilution.

The quantity of SO₂ in dried vine fruit samples was determined by aspiration method [20]. The method consists of 3 stages:

1. *Determination of free SO₂* – involves aspiration a mixture of sample homogenate and 25% phosphoric acid solution, for 15 minutes and titration with 0.01M NaOH solution until an olive green color appears. Registration of title value (A).

2. *Determination of bound SO₂* - involves aspiration 15 min and simultaneously heating solution with content of a sample homogenate. Titration of solution with 0.01 M NaOH until an olive green color appears. Registration of title value (B).

3. *Calculation*

$$\text{Free SO}_2 \text{ (mg/l)} = \frac{(A) \times M \times 32.06 \times 1000}{V} \quad \text{Bound SO}_2 \text{ (mg/l)} = \frac{(B) \times M \times 32.06 \times 1000}{V}$$

Total SO₂ (mg/l) = Free SO₂ (mg/l) + Bound SO₂ (mg/l),

M = molarity of the NaOH solution, V = sample volume

Results and discussion

In recent years the volume of imports of dried vine fruit exceeds the volume of its production in Armenia [17]. Dried grape are imported into Armenia mainly from Turkey, Iran, as well as from other countries: Uzbekistan, Kazakhstan and USA (California). The results showed that the contamination level of Armenian, Uzbek and Kazakh dried vine fruits by filamentous fungi often exceeds the maximum permissible level of this parameter presented in local and international sanitary rules and regulations (table 1). According to SanPin 2.3.2.1078-01 maximum permissible amount of diasporas of molds in 1 g of dried vine fruit is 5 x10² CFU/g.

Table 1. The number of fungi species in genera isolated from dried grape produced in different countries and the contamination level of samples

Genus	The number of species isolated from dried vine fruit samples produced in different countries				
	Armenia	Iran / Turkey*	USA	Uzbekistan	Kazakhstan
<i>Aspergillus</i>	13	6	3	3	3
<i>Penicillium</i>	10	4	2	2	2
<i>Mucor</i>	2	2	1	2	2
<i>Alternaria</i>	1	-	-	-	-
<i>Trichoderma</i>	-	1	-	-	-
<i>Syncephalastrum</i>	1	-	-	-	-
Total number of species	27	13	6	7	7
Contamination level (CFU/g)	2.2x10 ² – 4.3x10 ⁴	2.3x10 ² – 4.8x10 ²	1.8x10 ² – 3.64x10 ²	2.7x10 ² – 5.8x10 ³	1.82x10 ² – 1.7x10 ³

* Sometimes it was difficult to find out exactly from which country (Iran or Turkey) the product was imported

In order to identify the correlation between content of sulfur dioxide (SO₂) and contamination level of dried vine fruit by filamentous fungi, the quantities of bound and free sulfur dioxide were determined in 30 samples of dried vine fruits by aspiration method. The high total amount of sulfur dioxide up to 1350 mg/kg was observed in Iranian and Turkish samples (seedless variety) (Fig. 1). The contamination degree of these dried vine fruit samples (sultana) by micromycetes did not exceed the value of 1.9x10² CFU/g. In local produced samples of white varieties of dried vine fruit the content of bound and free sulfur dioxide met the requirements of Codex Alimentarius Commission [4].

At the 30 mg/kg residual amount of sulfur dioxide the contamination level of samples by fungi exceeded the value of 7.4x10² CFU/g. This does not meet the microbiological safety requirements set out in SanPiN 2.3.2.1078-01 [14]. The content of "free" sulfur dioxide (SO₂) in Iranian and Turkish samples was in range of 45 - 80 mg/kg. The inhibitory effect of SO₂ on quantity of viable spores - potential producers of ochratoxin A occurred when the residual amount of free sulfur dioxide was 60 mg/kg. In analyzed samples of Iranian and Turkish dried vine fruit the total content of sulfur dioxide was 900 - 1350 mg/kg, which did not exceed the maximum allowable concentrations. But it was very high and could harm consumer with diseases in upper respiratory tract. The total content of sulfur dioxide in samples of Armenian white dried vine fruit was detected within 600 - 800 mg/kg. Sporulation degree of these samples was in rang of 2.3x10² - 7.4x10² CFU/g (Fig. 1).

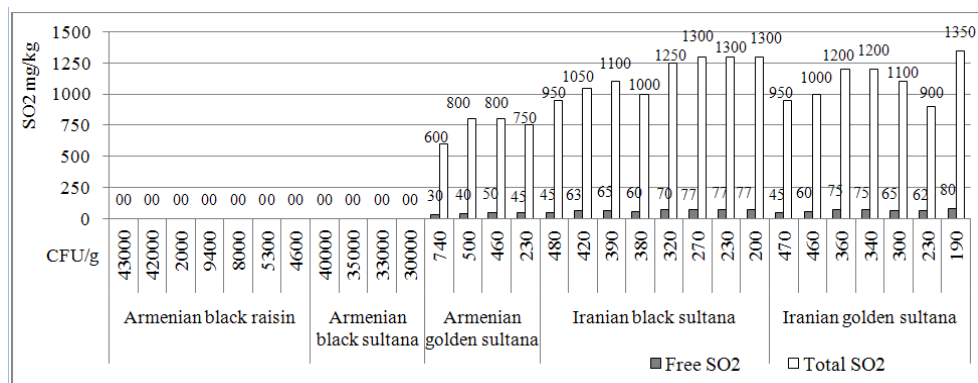


Fig. 1. Correlation between SO₂ content in dried vine fruit and their contamination level by filamentous fungi

Dried vine fruit produced from black or dark red grape varieties are not treated with sulfur dioxide, which causes the high contamination degree of black dried vine fruit samples by filamentous fungi. The results of mycological analysis of 11 Armenian black dried vine fruit samples showed high contamination levels of analyzed samples by micromycetes: in range of 4.6×10^3 – 4.3×10^4 CFU/g.

Sulfur dioxide and its derivatives have long been used for treatment of raw grape as a preservative inhibiting the development of mold-forming fungi and other microorganisms. Previously, SO₂ was included in the list of safe chemicals, for which no control was required. But based on the results of studies that proved its dangerous effect on the human health, today its quantity in food products is limited by the international sanitary rules and norms. For this reason many scientific works are done to find safe biological methods to prevent contamination of food products by filamentous fungi.

References

1. Battilani P., Giorni P., Bertuzzi T., Formenti S., Pietri A. Black aspergilli and ochratoxin A in grapes in Italy. *Int. J. Food. Microbiol.* 111. p. S53–S60. 2006.
2. Bau M., Bragulat M.R., Abarca M.L., Minguez S., Cabanes F.J. Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes. *Int J Food Microbiol.* 98. p.125–130. 2005.
3. Chervin C., Aked J., Crisosto C.H. Grapes: Post – harvest technology for dried grapes. *Crop Post-Harvest: Science and Technology*. First Edition. p. 195-197. 2012.
4. Codex Alimentarius Committee. CAC/RS 67-1974. Adopted 1981. Codex Standard for Raisin. Codex Stan. 6. p. 1-5. 1981.
5. Controle de la qualite des produits alimentaires controle micro biologique. NF ISO 7698-91. Directives generales pour le denombrement des levures et moisissures. 1993.
6. Covarelli L., Beccari G., Marini A., Tosi L. A review on the occurrence and control of ochratoxigenic fungal species and ochratoxin A in dehydrated grapes, non fortified dessert wines and dried vine fruit in the Mediterranean area. *Food Control.* 26. p. 347-356. 2012.
7. Gowda I.N.D. Evaluation of certain pre-treatments for raisin making. *Journal of Food Science & Technology*. Mysore. 37. p. 21–125. 2001.
8. Hocking A.D. Xerophilic fungi in intermediate and low moisture foods. *Handbook of applied mycology, foods and feed*. New York: Marcel Dekker Inc. 3. p. 69-97. 1992.
9. Leong S.L., Hocking A.D., Pitt J.I., Kazi B.A., Emmett R.W., Scott E.S. Australian research on ochratoxigenic fungi and ochratoxin A. *Int J Food Microbiol* 111. Suppl 1. p. S10–S17. 2006.
10. Magnoli C, Violante M, Combina M, Palacio G., Dalcero A. Mycoflora and ochratoxin-producing strains of black aspergilli in wine grapes in Argentina. *Letters in Applied Microbiology.* 37. p. 179-184, 2003.
11. Mannsville. Chemical Products Corp. Chemical: Sulfur Dioxide. NY. p. 199 – 213. 1985.
12. Pitt J.I., Hocking A.D. *Fungi and Food Spoilage*. 2nd Edition. Blackie Academic and Professional. London. 1997.
13. Sander U.H.F., Rothe U., Kola R. Sulphur dioxide and Sulphuric. *An Introduction to Their Industry Chemistry and Technology*, London, p. 151-254, 1984.
14. SanPiN 2.3.2.1078-01. Sanitary-epidemiological rules and regulations. Hygienic requirements for the safety and nutritional value of food, 2001.
15. Shanmugavelue K.G. Postharvest handling and marketing of grapes. *Viticulture*, India. 1989.
16. Settupane G.A. Adversereactions to sulfites in drugs and foods. *Am. Acad. Dermatol.* 10. p. 1077-1081. 1984.
17. Statistical Yearbook of Armenia - www.armstate.am
18. Stevenson D.D., Simon R.A. Sulfites and asthma. *Allergy clin. Immunol.* 74. p. 469-472. 1984.
19. Weil E.D. Sulfur compounds. *Encyclopedia of Chemical Technology*. 3rd ed. Vol. 22. New York. p. 107-167, 1983.
20. Wood R., Foster L., Damant A., Key P. *Analytical methods for food additives*. 2004.

THE POSSIBLE ROLE OF SEROTONIN AND ADENOSINE AT DIFFERENT ORIGIN NOXIOUS STIMULI INFORMATION REALIZATION

HARUTYUNYAN H.S.¹, SHALJYAN A.L.¹, SAHARYAN A.V.¹, ALAVERDYAN H.R.², VARDANYAN G.S.¹, AGHAJANOV M.I.¹

¹ Yerevan State Medical University

² "Darmantest" Laboratories

Transmission of pain from periphery to the cortex depends on integration and signal processing within spinal cord and higher structures of brain. Several molecular and biochemical mechanisms contribute to the phenomenon of sensitization and persistent pain, wherein every nociceptive factor has its own specific way of action.

The aim of this work is to observe the influence of different noxious agents on serotonin and adenosine level changes in different regions of central nervous system using as a background the modified version of classic formalin test.

We determined the levels of adenosine and serotonin evoked by formalin, capsaicin and Freund's adjuvant injection in the lumbar segment of the spinal cord and hippocampus using HPLC technique.

The role of abovementioned mediators at different levels of nociceptive information transmission is discussed.

pain, modification of formalin test, serotonin, adenosine, high performance liquid chromatography.

Ցավային ազդակների փոխադրումը ծայրամասից դեպի գլխուղեղի կեղև կախված է ողնուղեղում և գլխուղեղի կառուցվածքներում ինտեգրացիայից և ազդակի պրոցեսինգից: Բազմաթիվ մոլեկուլային և կենսաքիմիական մեխանիզմներ հանգեցնում են սենսիտիզացիայի և հարատև ցավի առաջացման, որտեղ յուրաքանչյուր ցավ առաջացնող գործոն ունի իր յուրահատուկ գործելաոճը:

Աշխատանքի նպատակն է դիտարկել տարբեր ցավ առաջացնող ազդեցությունը սերոտոնինի և ադենոզինի կոնցենտրացիայի վրա կենտրոնական նյարդային համակարգի տարբեր բաժիններում՝ հիմք ընդունելով դասական ֆորմալինային թեստի մոդիֆիկացված տարբերակը:

Մեր կողմից որոշվել է ֆորմալինի, կապսայցինի և Ֆրոյնդի ադյուվանտի առաջացրած ցավի արդյունքում ադենոզինի և սերոտոնինի կոնցենտրացիան ողնուղեղի գոտկային բաժնում և հիպոկամպում բարձր արդյունավետության հեղուկային քրոմատոգրաֆիայի եղանակով:

Ձևարկված է վերը նշված միջնորդանյութերի դերը ցավային տեղեկատվության փոխանցման տարբեր մակարդակներում:

ցավ, ֆորմալինային թեստի մոդիֆիկացիա, սերոտոնին, ադենոզին, բարձր արդյունավետության հեղուկային քրոմատոգրաֆիա:

Трансмиссия боли с периферии в кору головного мозга зависит от интеграции и процессинга в спинном мозге и высших структурах головного мозга. Различные молекулярные и биохимические механизмы вовлечены в феномен сенситизации и пролонгированной боли, при этом каждый ноцицептивный фактор имеет свой специфический путь влияния.

Целью данного исследования является изучение влияния различных боль-индуцирующих факторов на уровне серотонина и аденозина в различных участках центральной нервной системы с использованием модифицированной модели классического формалинового теста.

Нами было проведено определение уровня серотонина и аденозина в люмбарном сегменте спинного мозга, а также в гиппокампе с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Обсуждается роль вышеотмеченных медиаторов на различных уровнях передачи ноцицептивной информации.

боль, модифицированный формалиновый тест, серотонин, аденозин, высокоэффективная жидкостная хроматография.

Introduction

The amazing property of our nervous system is detecting and interpreting a wide range of thermal and mechanical stimuli, environmental and endogenous chemical irritants. When intense, these stimuli generate acute pain, and the setting of persistent injury, both peripheral and central nervous system components of the pain transmission pathway exhibit tremendous plasticity, enhancing pain signals and producing hypersensitivity. When plasticity facilitates protective reflexes, it can be beneficial, but when the changes persist, a chronic pain condition may result. Biochemical, electrophysiological and pharmacological studies are elucidating the molecular mechanisms that underlie detection, coding, and modulation of noxious stimuli that generate pain.

In functioning of nociceptive and antinociceptive systems a special modulating role belongs to different neurotransmitters and neuromediators, particularly serotonin and adenosine.

Serotonin is a mediator in central nervous system, which participates in sensation of pleasure, comfort, regulation of cognitive functions, appetite, sleep/awake processes. The pathways in nervous system which participate in perception of painful signals intersect with those which participate in regulation of emotional status, particularly on serotonin level.

Results of some investigations have shown a spinal analgesic action of 5-HT released from brainstem structures [20, 21]. Since 1969, researchers have investigated stimulation-induced analgesia, which reveals that serotonin (5-HT) excites inhibitory interneurons, resulting in inhibition of dorsal horn neurons [9].

It is shown that the reduction of serotonin concentration leads to attenuation of analgesic effect [3], reduction of pain threshold [10] a higher frequency of pain syndrome development.

Serotonin reuptake inhibitors in certain cases are used to reveal the chronic pain. It is supposed, that the analgesic effect of serotonin can be partly mediated by endogenous opioid system as serotonin promotes the release of beta-endorphin from anterior pituitary cells [22].

Contemporaneously it is proven that exogenous serotonin induces a severe pain in the site of injection. Presumably serotonin along with histamine and prostaglandins plays a role in development of pain impulsation in the locus of injury or inflammation affecting the corresponding receptors in target tissues [19].

The stimulation of large sensory fibers leads to the release of adenosine triphosphate (ATP) from their terminals in posterior horns of spinal cord. The ATP then transforms into adenosine, which affecting the specific A1 receptors blocks the transport of nociceptive information in synapses of thin sensory fibers. However depending on dose adenosine can demonstrate an opposite effect, enhancing nociception. Thus, adenosine is considered as neurotransmitter, which has a modulatory effect on pain formation mechanisms [18].

The aim of this work is to observe the effect of different noxious agents in some regions of nervous system on serotonin and adenosine level using modified model of classic formalin test.

Materials and methods

In this study male albino rats were used weighting 200-250g. The animals were housed in plastic cages by six. The minimal adaptation period was 10 days. The rats were kept in 12 hour light/dark cycle with food and water ad libitum. The experiments were approved by Ethics Committee of Yerevan State Medical University.

In our experiments 7 groups were used: 1. Control group, 2. Single injection of 5% formalin solution, 3. Two subsequent injections of 5% formalin solution with five days

interval, 4. Two subsequent injections of Freund's adjuvant with 5 days interval, 5. Two subsequent injections of capsaicin, 6. Two subsequent injections of 10% and 5% formalin solution respectively with 5 days interval, 7. Two subsequent injections of 5% formalin with 5 days interval, where gabapentin was administrated 10 minutes before the second injection.

Formalin test. In our experiments we used the modification of classic formalin test by adding the second injection of noxious agent with five days interval. Before any injections rats were let in glass chamber for adaptation for 15 minutes. A 5% formalin solution (0.5ml/kg) was subcutaneously injected into the dorsal surface of hind paw. After injection each animal was returned into the glass chamber with a glass in the bottom to observe limb position changes hidden from frontal view. The pain behavior was registered for an hour using a computer program (Lab View, National Instruments) written by us [6], which allows to record animal's per second pain behavior using the scale from 0 to 4, where 0 – there is no pain behavior, 1- the injected paw changes its position but is still in the contact with the floor of chamber, 2- the injected paw is over the chamber floor and there is no contact with any surface, 3- the injected paw is flinched, 4- the injected paw is licked. Pain behaviors are expressed during each period of three minutes intervals during the initial acute phase (0–10 min) or the second, tonic phase (15–60 min). The animals undergo euthanasia immediately after the end of experiment with a Nembutal solution (100mg/kg).

High performance liquid chromatography (HPLC). Samples were taken from rat spinal cord, hippocampus and prefrontal cortex immediately after the decapitation within a minute. All the samples were freeze-dried, then homogenized, centrifuged in 20000 rpm. Sample preparation: a protein precipitation technique was used by adding 3 times more acidified acetonitrile. After the centrifugation with 12000 rpm speed the supernatant was transferred to LC-MS. The mobile phase had the following composition: 0.1% formic acid aqueous solution: acetonitrile 60:40. The flow rate was 0.4 mL/min, injection volume was 10µL. 268.0-136.0 MRM transition was used for Adenosine MS detection and 177.0-160.0 MRM transition was implied for serotonin MS detection. The calibration curve used covered concentrations between 6.5 ng/ml and 650 ng/ml for quantitation of adenosine, and 10 ng/mL and 10 mcg/mL for quantitation of serotonin.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed by the one-way ANOVA (IBM SPSS version 23.0 and MS Excel 2007). A multiple comparison Post Hoc Test (Tukey) was applied to identify groups differing significantly from each other using Bonferroni correction. Data were reported as mean ± SEM.

Results and discussion

As results of our experiments demonstrated, formalin injection into the dorsal surface of the left hind paw led to a two-phase pain response: first phase starts immediately after injection of noxious agent and lasts until 10 min and the second tonic phase, which starts at 15 minutes and lasts until 60 min.

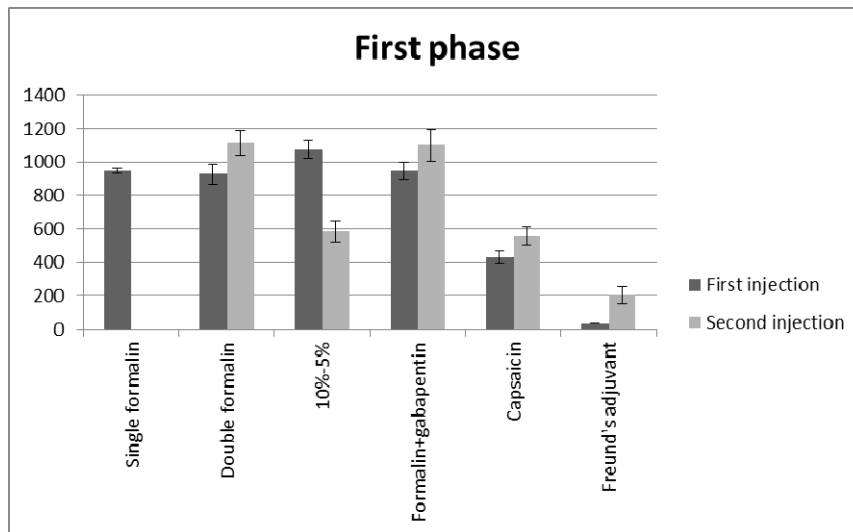


Fig. 1. The value of the pain response (the values shown on vertical axis are obtained by summation of per second pain behavior of experimental animals after injection of noxious agent during the first 15 minutes, where 0 = the injected paw is not favored, 1 = injected paw has little or no weight on it, 2 = the injected paw is elevated and there is no contact with any surface, 3=the injected paw is flinched or shaken, 4 = the injected paw is licked) in the injected paw in the first phase during single and double injections of noxious agent in the modified formalin test.

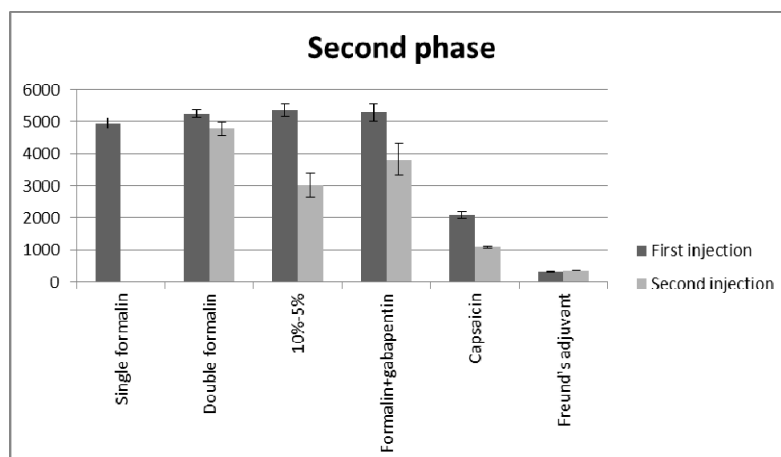


Fig. 2. The value of pain response after formalin injection during the last 45 minutes (the pain intensity is calculated as in Fig. 1) in the injected paw in the second phase during single and double injections in the modified formalin test.

As it can be seen from the results, all the noxious agents (formalin, capsaicin, Freund's adjuvant) demonstrated similar patterns in both phases. In the first phase, in double formalin group, the value of the second injection was higher. The formalin+gabapentin group did not demonstrate any changes in first phase, which is in agreement with literature data [1, 16], indicating that gabapentin does not affect the acute phase in formalin test. In the group with subsequent injection of 10% and 5% formalin the first injection value is higher as it could be expected, but in the second injection the pain value significantly lowers. Both, capsaicin and Freund's adjuvant, demonstrate a similar pattern with formalin, showing lower values.

Concerning to the second phase, in almost all groups the second injection value was lower, than the first one. The lowest value compared with the first injection reveals the group with subsequent injections of 10% and 5% formalin. Gabapentin significantly lowered the second phase of the formalin test.

HPLC results

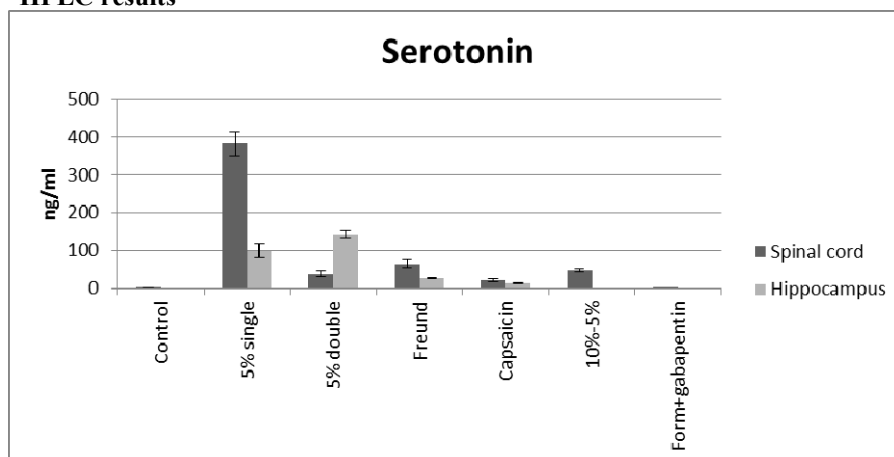


Fig. 3. The quantitative definition of serotonin in rat spinal cord and hippocampus measured by HPLC

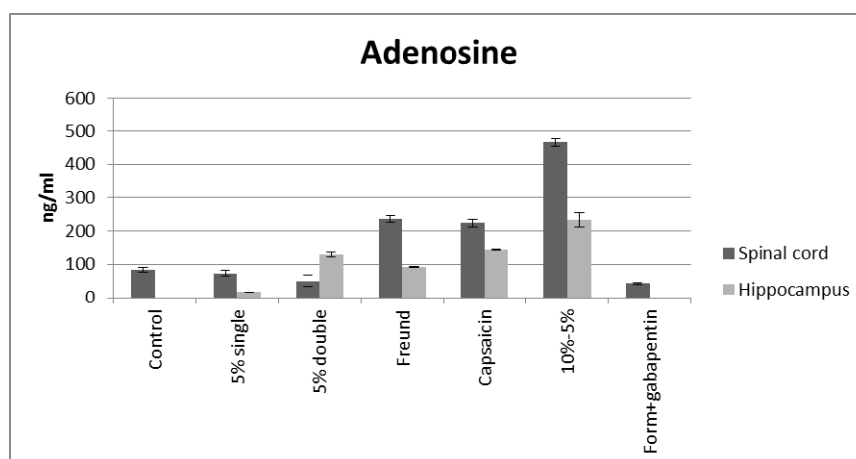


Fig. 4. The quantitative definition of adenosine in rat spinal cord and hippocampus measured by HPLC

As figure 3 show, the highest level of serotonin can be observed in the group with single injection of 5% formalin. The injection of formalin increases serotonin level both in spinal cord and hippocampus [17].

The slight changes of serotonin level were observed in all the other groups. Some literature data indicate, that the injection of Freund's adjuvant significantly increases the serotonin level both in spinal cord and in hippocampus [4]. The minor changes can be explained presumably by insufficient time for inflammation to develop. In the group with subsequent injection of 10% and 5% formalin the low concentration of serotonin can be explained most likely by the increased pain threshold, which is likewise observed in formalin test in both first and second phases.

Interestingly in formalin+gabapentin group the serotonin level was about zero, despite some works indicate, that gabapentin increases blood serotonin [12].

Gabapentin decreased the serotonin level both in spinal cord and in hippocampus. However, several observations are consistent with the idea that gabapentin modulates Ca^{2+} channels, particularly if channels are modulated in a subtle manner. It is possible, that inhibition of monoamine neurotransmitter release [2,13,15] is caused by an interaction of gabapentin with Ca^{2+} channels. However, there are some results, indicating that gabapentin increases the concentration of serotonin in whole blood [12]. These authors speculate, that increased serotonin might be due to changes in serotonin metabolism or uptake in platelets.

The inhibitory action of serotonin on structures of the dorsal horn may be mediated by activation of opioid-releasing interneurons. In animal models the opioid antagonists attenuate the analgesic effect of intraspinal serotonin; similarly, serotonin antagonists interfere with analgesic effects of morphine infused in or near the spinal cord [8].

Serotonin is released in spinal cord by descending systems that modulate somatosensory transmission and can potently depress primary afferent-evoked synaptic responses in dorsal horn neurons.

Additionally, serotonin receptor antagonists, given to rats intrathecally, inhibited experimental pain response [5], suggesting, that excitatory serotonergic descending pathways facilitate the expression of pain. It is likely, that serotonin inhibits, as well as promotes pain perception by different physiological mechanisms [7].

As it can be seen from Fig. 4, the highest level of adenosine is observed in the group with subsequent injection of 10% and 5% formalin both in spinal cord and hippocampus. Interestingly, the concentration of adenosine lowered while administrating gabapentin.

Adenosine regulates pain transmission in the spinal cord and in the periphery, and a number of agents can alter the extracellular availability of adenosine and subsequently modulate pain transmission, particularly by activation of adenosine A1 receptors.

Moreover, there is a significant increase of adenosine level in Freund's adjuvant and capsaicin groups in spinal cord and hippocampus. The use of capsaicin (which activates receptors selectively expressed on C-fibre afferent neurons and produces neurotoxic actions in certain paradigms) allows for an interpretation of C-fibre involvement in such processes. In the spinal cord, adenosine availability/release is enhanced by depolarization (K^+ , capsaicin, substance P, N-methyl-D-aspartate (NMDA)), by inhibition of metabolism or uptake (inhibitors of adenosine kinase (AK), adenosine deaminase (AD), equilibrative transporters), and by receptor-operated mechanisms (opioids, 5-hydroxytryptamine (5-HT), noradrenaline (NA)). Some of these agents release adenosine via an equilibrative transporter, indicating production of adenosine inside the cell (K^+ , morphine), while others release nucleotide which is converted extracellularly to adenosine by ecto-5'-nucleotidase (capsaicin, 5-HT). Release can be capsaicin-sensitive, Ca^{2+} -dependent and involve G-proteins, and this suggests that within C-fibres, Ca^{2+} -dependent intracellular processes regulate production and release of adenosine. In the periphery, adenosine is released from both neuronal and non-neuronal sources. ATP is released both spinally and peripherally following inflammation or injury, and may be converted to adenosine by ecto-5'-nucleotidase contributing an additional source of adenosine. Release of adenosine from both spinal and peripheral compartments has inhibitory effects on pain transmission [14].

Conclusion

The pain information in the CNS is controlled by ascending and descending regulatory systems, in which endogenous substances play a modulatory role.

Serotonin acts substantially on spinal cord level, and affects descending pain pathway. It is important to mention, that classic formalin test, which proposes a single injection of formalin, significantly increases serotonin level in spinal cord. So it can be considered as “early” stimulation-produced mediator.

Possibly, the stimulus intensity is also related with serotonin release. Interestingly it is in agreement with our results of formalin test. It represents the second phase. In formalin test all the second injections are lower compared with the first injections. Concerning to adenosine, it is possibly a “late” mediator. Adenosine represents the first phase of formalin test respectively with first and second injections.

Presumably, regulation of descending inhibitory modulation proposes, that or higher brain areas directly communicate with descending nociceptive fibers, either this communication is polysynaptic, acting through intermediate relays.

So our results let us to conclude, that the route from higher brain areas is not direct and depends on variety of factors, i.e. stimulus intensity, type of injury, number of injections, thus, the intermediate levels of descending pain pathway can undergo changes, affecting the level of mediators at spinal cord level.

References

1. *Field M.J., Oles R.J., Lewis A.S., McCleary S., Hughes J., Singh L.* Gabapentin (neurontin) and S-(+)-3-isobutylgaba represent a novel class of selective antihyperalgesic agents. *Br J Pharmacol.* 1997;121(8): 1513-1522.
2. *Fink K., Meder W., Dooley D.J., G'htert M.* Inhibition of neuronal Ca²⁺ influx by gabapentin and subsequent reduction of neurotransmitter release from rat neocortical slices. *Br J Pharmacol.* 2000; 130(4): 900-906.
3. *Fox M.A., Jensen C.L., Murphy D.L.* Tramadol and another atypical opioid meperidine have exaggerated serotonin syndrome behavioral effects, but decreased analgesic effects, in genetically-deficient serotonin transporter (SERT) mice. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2009; 12(8): 1055-1065.
4. *Giordano J., Rogers L. V.* Peripherally administered serotonin 5-HT₃ receptor antagonists reduce inflammatory pain in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 1989; 170, 83-86.
5. *Gray A.M., Pache D.M., Sewell R.D.* Do alpha₂-adrenoceptors play an integral role in the antinociceptive mechanism of action of antidepressant compounds? *Eur. J. Pharmacol.* 1999; 378:161-168.
6. *Harutyunyan H., Alaverdyan H., Grigoryan A., Vardanyan G.* Observation of pain intensity and mirror pain phenomenon in double formalin test using different dosages of formalin. The International Young Scientists Conference “Perspectives for Development of Molecular and Cellular Biology-3”, 2012; 27-29.
7. *Marks D.M., Shah M.J, Patkar A.A., Masand P.S, Park G.Y., Pae C.U.* Serotonin-Norepinephrine Reuptake Inhibitors for Pain Control: Premise and Promise. *Curr Neuropharmacol.* 2009; 7(4): 331-336.
8. *McHugh J.M., McHugh W.B.* Pain: neuroanatomy, chemical mediators, and clinical implications. *AACN Clin. Issues.* 2000;11:168-178.
9. *Peng Y. B., Lin Q., Willis W. D..* The role of 5-HT₃ receptors in periaqueductal gray-induced inhibition of nociceptive dorsal horn neurons in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1996; 276, 116-124.
10. *Pickering G., Januel F., Dubray C., Eschaliere A.* Serotonin and experimental pain in healthy young volunteers. *Clin J Pain.* 2003; 19(4):276-279.
11. *Rao M.L., Clarenbach P., Vahlensieck M., Kraetzschmar S.,* Gabapentin augments whole blood serotonin in healthy young men. *J. Neural. Transm.* 1988;73, 129-134.
12. *Rao M.L., Clarenbach P., Vahlensieck M., Kraetzschmar S.* Gabapentin augments whole blood serotonin in healthy young men. *J Neural Transm.* 1988;73(2):129-34.

13. Reimann W., Inhibition by GABA, baclofen and gabapentin of dopamine release from rabbit caudate nucleus: are there common or different sites of action? *Eur. J. Pharmacol.* 1983;94, 341-344.
14. Sawynok J., Liu X.J. Adenosine in the spinal cord and periphery: release and regulation of pain. *Prog Neurobiol.* 2003; 69(5):313-40.
15. Schlicker E., Reimann W., Gothert M., Gabapentin decreases monoamine release without affecting acetylcholine release in the brain. *Drug Res.* 1985; 35, 1347-1349.
16. Singh L., Field M.J., Ferris P., Hunter J.C., Oles R.J., Williams R.G., Woodruff G.N. The antiepileptic agent gabapentin (Neurontin) possesses anxiolytic-like and antinociceptive actions that are reversed by D-serine. *Psychopharmacology (Berl).* 1996; 127(1):1-9.
17. Soleimannejad E., Naghdi N., Khatami Sh., Semnani S., Fathollahi Y. Formalin pain increases the concentration of serotonin and its 5-hydroxyindoleacetic acid metabolite in the CA1 region of hippocampus *Daru.* 2010; 18(1): 29-34.
18. Sollevi A. Adenosine for pain control. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl.* 1997;110:135-136.
19. Sommer C. Serotonin in pain and analgesia. Actions in the periphery. *Mol Neurobiol.* 2004; 30, Issue 2, 117-125.
20. Yaksh T. L., Wilson P. R.. Spinal serotonin terminal system mediates antinociception. *J.Pharmacol. Exp. Ther.* 1979; 208, 446-453.
21. Yaksh T., Tyce G. Microinjections of morphine into the periaqueductal gray evokes the release of serotonin from spinal cord. *Brain Res.* 1979;171, 176-181.
22. Zangen A., Nakash R. and Yadid G. Serotonin-Mediated Increases in the Extracellular Levels of β -Endorphin in the Arcuate Nucleus and Nucleus Accumbens: A Microdialysis Study. *J Neurochem.* 1999; 73, Issue 6, 2569-2574.

Biolog. Journal of Armenia, 1 (69), 2017

THE CHANGE OF POLYAMINES AND NITRIC OXIDE QUANTITIES IN HUMAN BLOOD SERUM OF PROSTATE AND BLADDER CANCER

**JAVRUSHYAN H.^{1*}, AVTANDILYAN N.², MAMIKONYAN A.¹,
TRCHOUNIAN A.^{1,2}**

*¹Department of Biochemistry, Microbiology and Biotechnology, Yerevan State University ²Research
Institute of Biology, Yerevan State University, Yerevan, Armenia.
hg.javrushyan@ysu.am*

Currently are shown rapid growth of polyamines and nitric oxide (NO) quantities in blood serum during malignant tumors in different organs. Increased NO generation in cancer cells may contribute to tumor angiogenesis and metastatic ability by up-regulating vascular endothelial growth factor. The goal of work was to research in human blood serum the changes of polyamines and NO quantities in different stages of prostate and bladder cancer. Polyamines and NO quantities were determined in blood serum of 11 healthy individuals (34-63 years old) and patients with prostate (28) and bladder (20) cancers (48 patient, I-III stages, 44-73 years old) who were hospitalized in the National Centre of Oncology RA aft. V.A. Fanarjyan. Total polyamines quantity compared with standard was increased by 42.5%, 54.5% and 76.8%, respectively in I, II and III stages of prostate cancer, and 59.5%, 64.8% and 87.9%, respectively in I, II and III stages of bladder cancer. The quantity of nitrite anions was increased by 125% in prostate and bladder cancers patients blood serum. The increase of NO and polyamines concentrations in blood serum in earlier stages and the increase in parallel to cancer development confirm, that this metabolic pathway of L-arginine has a significant role in promoting tumor growth and development. We suggest that downstream of polyamines and NO quantities might have antitumor effect on cancer development.

cancer, polyamine, NO, arginase, tumorigenesis, antitumor potential

Ներկայումս ցույց է տրված պոլիամիններին NO-ի քանակության կտրուկ աճը արյան շիճուկում տարբեր օրգաններում չարորակ ուռուցքների առկայության ժամանակ: Քաղցկեղային բջիջներում NO-ի և պոլիամինների արտադրման աճը կարող է նպաստել ուռուցքի անգիոգենեզին և մեծացնել մետաստատիկ հնարավորությունները՝ խթանելով անոթային էնդոթելիալ աճի գործոնը: Մեր հետազոտության նպատակն է ուսումնասիրել մարդու արյան շիճուկում պոլիամիններին NO-ի քանակության փոփոխությունները շագանակագեղձի և միզապարկի քաղցկեղի զարգացման տարբեր աստիճանների ժամանակ: Պոլիամիններին NO-ի քանակական փոփոխությունները ուսումնասիրվել է 11 առողջ անհատի (34-63 տարեկան), շագանակագեղձի և միզապարկի քաղցկեղ ունեցող հիվանդների արյան շիճուկում (48 հիվանդ, I-III աստիճան, 44-73 տարեկան), որոնք հետազոտության են գրանցվել Ֆանարջյանի անվան ՀՀ Ուռուցքաբանական Ազգային Կենտրոնում: Շագանակագեղձի քաղցկեղի դեպքում պոլիամինների գումարային քանակը առողջ խմբի համեմատ աճում է 42.5%, 54.5% և 76.8%-ով, իսկ միզապարկի քաղցկեղի ժամանակ՝ 59.5%, 64.8% և 87.9%-ով, համապատասխանաբար քաղցկեղի զարգացման I, II և III աստիճաններում: Ստացված արդյունքները ցույց են տվել, որ ստուգիչ խմբի համեմատ արյան շիճուկի նիտրիտ անիոնների քանակը շագանակագեղձի և միզապարկի քաղցկեղի դեպքում աճում է 125%-ով: Հիվանդության վաղ փուլերում պոլիամիններին NO-ի քանակության աճը արյան շիճուկում և հետագա բարձրացումը զարգացման աստիճանին զուգահեռ՝ հաստատում է L-արգինինի նյութափոխանակային ուղղու այս մետաբոլիտների կարևորագույն դերը ուռուցքի աճի խթանման և զարգացման գործընթացներում: Մենք եզրակացնում ենք, որ պոլիամիններին NO-ի քանակության նվազումը կարող է ունենալ հակաուռուցքային ազդեցություն քաղցկեղի զարգացման գործընթացում:

քաղցկեղ, պոլիամին, NO, արգինազ, ուռուցքազոյացում, հակաուռուցքային պոտենցիալ

В настоящее время установлено увеличение количества полиаминов и окиси азота (NO) в сыворотке крови во время злокачественных новообразований в разных органах. Увеличение количества NO и полиаминов в раковых клетках может способствовать ангиогенезу опухоли и метастатическим способностям с помощью регулирующего фактора роста эндотелия сосудов. Целью работы было исследование изменения количества полиаминов и NO в сыворотке крови человека на разных стадиях развития рака простаты и мочевого пузыря. Количество полиаминов и NO определяли в сыворотке крови 11 здоровых (34-63 лет) и пациентов с раком предстательной железы (28) и мочевого пузыря (20) (48 пациентов, I-III стадии, 44-73 года), которые были госпитализированы в Национальный Центр Онкологии РА имени Фанарджяна. Общее количество полиаминов по сравнению со стандартом увеличивается на 42.5%, 54.5% и 76.8% соответственно на I, II и III стадиях рака предстательной железы и на 59.5%, 64.8%, 87.9% соответственно на I, II и III стадиях рака мочевого пузыря. Результаты исследований показали, что количество анионов нитрита было увеличено на 125% в сыворотке крови больных раком предстательной железы и мочевого пузыря. Увеличение концентрации NO и полиаминов в сыворотке крови на ранних стадиях и увеличение параллельно с развитием рака подтверждают, что этот метаболический путь L-аргинина играет важную роль в стимулировании роста и развития опухоли. Мы предполагаем, что понижение количества полиаминов и NO может оказать противоопухолевое воздействие на развитие рака.

рак, полиамины, NO, аргиназа, опухолегенез, противоопухолевый

Introduction

The heterogeneous nature of prostate and bladder cancers makes it difficult to understand the molecular mechanisms controlling benign and malignant cell growth [6]. Therefore, it is important to continue to improve current diagnostic and treatment tools and determine new prognostic variables. According to the World Health Organization, the age-standardized death rate due to cancer in Armenia is 39.6 per 100,000; making it the first highest nation globally for cancer deaths [12]. Earlier reports focused on the expression of arginase and NO-synthase (NOS) in murine or human primary cancer tissue as well as malignant cell lines and emphasized its potential role in the promotion of tumour growth via polyamine synthesis or down-regulation of NO-mediated tumour cytotoxicity [5, 9]. Since polyamines are vital for cell proliferation, it is possible that the increased level of ornithine, due to the elevated arginase activity, linked to the development of carcinogenesis [3]. Over past decades, NO has emerged as a molecule of interest in carcinogenesis and tumor growth progression [2]. NO either facilitates cancer-promoting characters or act as an

anticancer agent. The dilemma in this regard still remains unanswered. Increased NO generation in cancer cells may contribute to tumor angiogenesis by up-regulating vascular endothelial growth factor (VEGF), and VEGF-induced neovascularization may increase the tumors' metastatic ability. Although several reports have addressed the protumoral effects of NO, few have demonstrated the contrasting role of NO in mediating tumor regression. The studies have shown that high levels of NO inhibit epithelial-mesenchymal transition (EMT) and reverses both the mesenchymal phenotype and the invasive properties of human prostate metastatic cells. Although these tumoricidal roles of NO have been proposed, most experiments have been performed in vitro and such findings have not been reported in cancer patients. It has been suggested that NO concentrations found in tumors are insufficient to produce apoptosis and other tumoricidal effect and are likely to facilitate angiogenesis and tumor dissemination.

The goal of this article was to study the involvement of arginase and NO-synthase in prostate and bladder cancers development by the change of polyamines and NO quantities.

Materials and methods

Patients. This study was performed with blood serum of patients with prostate and bladder cancers who were hospitalized in the National Center of Oncology named after V.A. Fanarjyan (Yerevan, Armenia). Arginase activity, polyamines and NO quantities were determined in blood serum of 11 healthy individuals (34-63 years old) and patients with prostate (28, male) and bladder (20, male and female) cancer (48 patients, I-III stages, 44-73 years old). None of the patients had received chemotherapy. The Tumor-Nodes-Metastasis (TNM) system was used to describe the cancer stages (Table 1). The surgical intervention and also other diseases of the patients in different stages of disease development was not taken into account. The study was approved by the Bioethics Committee of Armenia, and informed consent was obtained from all patients.

Chemicals. Chemicals for determination of arginase activity, NO quantity and TLC were obtained from Sigma Aldrich Co. Ltd. and Carl Roth GmbH + Co. KG (Germany).

Determination of arginase activity. Arginase activity was determined by the colorimetric method of Van Slyke and Archibald with some modifications [1, 8]. In supernatant was determined the final product of the catalysis (urea). 1 ml supernatant, 0.25 ml 3% (w/v) diacetyl monoxime (DAMO) were added and boiled in water bath during 45 min. The intensity was measured with spectrophotometer in 487 nm. Activity of enzyme was evaluated with the received urea, in micromoles in 1 sec (kat).

Separation of serum arginase. For purification of the enzyme the procedure described by Berüter et al. for human liver and erythrocytes, was used with some modifications [8]. Separation of arginase isoenzymes were performed by the method of Kossman with some modifications [1, 8]. The column (2×40 cm) containing Sephadex G-150 was balanced with Na-phosphate buffer (pH 7.2) and 40 fractions each one of 4 ml were collected. 4 ml of low-molecular-weight protein fraction after gel-filtration was passed through the column CM-cellulose (CM52, 1×18 cm), balanced against 5 mM Tris-HCl buffer, pH 7.2, elution speed was 24 ml/h, 32 fractions each one of 4 ml were collected. The peak of arginase activity adsorbed on the column with a linear KCl gradient (0.0–0.5 M).

Dansylation and thin layer chromatography (TLC) analysis. The method of Seiler (1970) was used with some modifications as follows [4]. Tissues were extracted in 0.2M cold HClO₄ at a ratio of about 100 mg/ml HClO₄. Dansylpolyamines were extracted in 0.5 ml benzene, and vortexed for 30s. The chromatogram was developed for about 2h with chloroform-triethylamine (25:2, v/v) solvent system. The dansylpolyamine bands were

scraped, eluted in 2 ml ethyl acetate, and quantified in 505 nm. The quantity of polyamines is presented in nM polyamines in 1 ml serum.

Griess assay for NO quantity. Nitrite was measured by the Griess assay [11]. Briefly, 100 μ l Griess reagent were added to 100 μ l of each of the above supernatants. The plates were read at 550 nm against a standard curve of NaNO_2 . The values were corrected for the $\text{NO}^{2-} + \text{NO}^{3-}$ content of water, and the recovery of NO^{2-} was calculated.

Data processing. Results were expressed as means $\pm$ SD and evaluated by Student's *t*-test (single sample) using Statistica software (StatSoft 10.0).

Results and discussion

The aim of this work was to study the correlation between arginase activity, polyamines and NO quantities at prostate and bladder cancer and in case of possibility, to suggest use it as a diagnostic test and treatment. We found an increase of arginase activity in 73,8% of patients (True Positive, Table 1). The calculated values of arginase activity test sensitivity $[\text{TP}/(\text{TP} + \text{FN})]$, specificity $[\text{TN}/(\text{TN} + \text{FP})]$ and accuracy $[(\text{TP} + \text{TN})/(\text{TP} + \text{FP} + \text{FN} + \text{TN})]$ in serum of prostate and bladder cancer patients were 83.4%, 81.7% and 83%, respectively (see Table 1).

In prostate and bladder cancer group of stage I activity of serum arginase was increased by 61,52%, in the group of stage II by 118,27% and the group of stage III by 194,23% comparing to the healthy group (Fig. 1). This insinuates that arginase may have some role in promoting tumor growth and development and its activity can be considered as an important marker to determine disease progression or regression.

Table 1. Characteristics of patients and arginase activity test in blood serum from patients with prostate and bladder cancer.

Patients	Sex	Age	Cancer	Stage	TNM	Characteristic of test	Number of patients	%
11	Male and Female	49 $\pm$ 15	-	-	-	True positive (TP)	40	67.8
16		60 $\pm$ 11	Prostate (men, 28) and bladder (women and men, 20)	I	$\text{T}_1\text{N}_0\text{M}_0$	False positive (FP)	2	3.4
19		58 $\pm$ 14		II	$\text{T}_{2a}\text{N}_0\text{M}_0$, $\text{T}_{2b}\text{N}_0\text{M}_0$	True negative (TN)	9	15.2
13		64 $\pm$ 9		III	$\text{T}_{3a}\text{N}_0\text{M}_0$, $\text{T}_{3b}\text{N}_0\text{M}_0$, $\text{T}_{4a}\text{N}_0\text{M}_0$	False negative (FN)	8	13.5

In blood serum patients with prostate and bladder cancers Gel chromatography (GC) revealed 1 peaks for arginase activity ($V_e = 104$ -116 ml) and 2 peaks for protein quantity ($V_e = 44$ -52 and 104-116 ml) (Fig. 2).

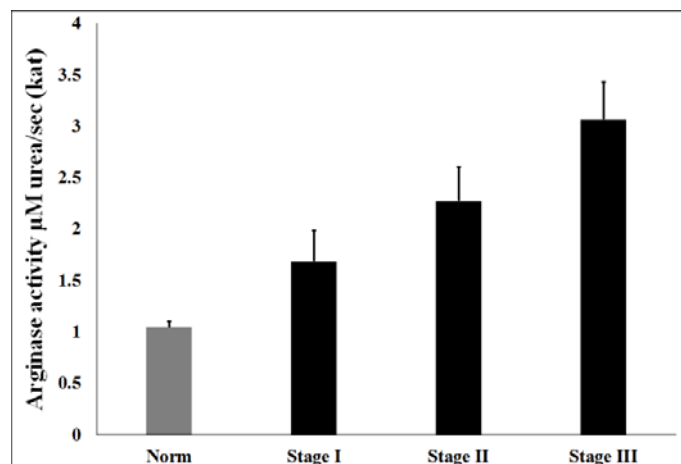


Fig. 1. The change of arginase activity in blood serum during different stage of prostate and bladder cancer (n=patients in table 1, $p<0.001$).

The influence of substrate concentrations, varying from 0.1 to 2 mM, on enzymic activity (fractions after Gel chromatography, 104-116ml, for each cancer group $n=7$, $p<0.05$) was studied in 0.2 M Glycine buffer (pH 9.5), 0.2 ml 5μM $MnCl_2$. From this data a Lineweaver-Burk plot with a K_m value of 2 mM was calculated for human serum arginase with prostate and bladder cancers, which is near by characteristic for the liver and erythrocytes type isoform of arginase (arginase I).

To confirm this fact, Ion-Exchange chromatography (IEC) of the second peak fraction (low-molecular fraction, $V_e = 116$ (A) and 104 (B) ml) was performed. In Ion-Exchange chromatography arginase activity curve is presented with 1 cationic isoenzyme peak ($V_e = 92$ ml), (see Fig. 2, Cand D). For prostate and bladder cancers, it was revealed that the only isoenzyme expressed in serum was cationic form (arginase I) (see Fig. 2).

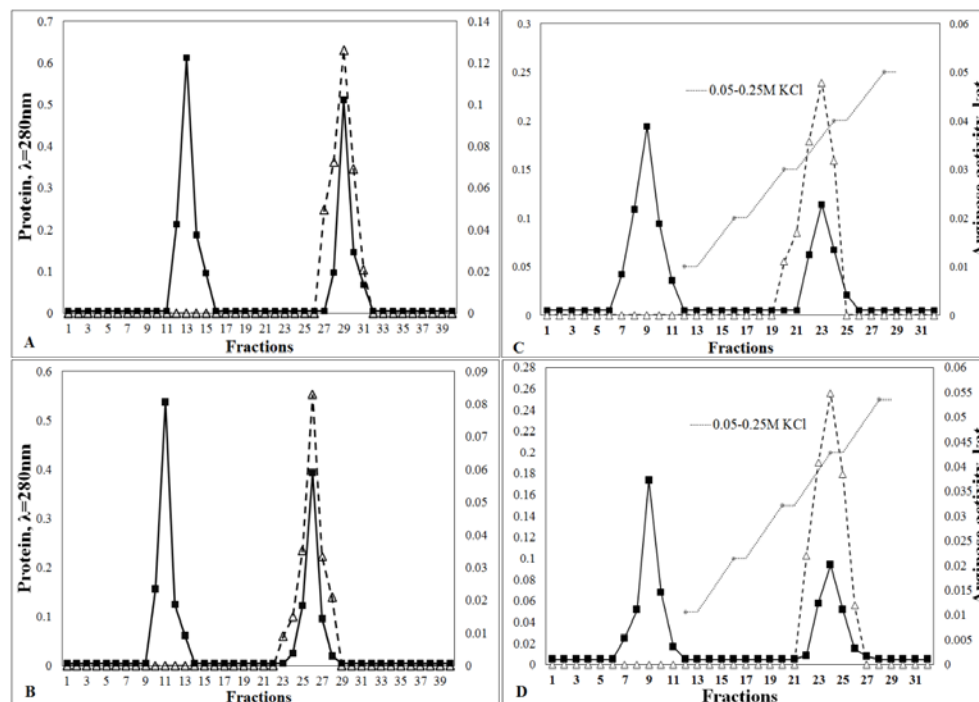


Fig. 2. Arginase activity (Δ) and protein quantity ($\blacksquare$) curves after Gel (A, B) and Ion-Exchange (C, D) chromatography of serum proteins prostate (A, C) and bladder (B, D) cancers patients ($n=7$, $p<0.05$) (stage II). For Gel chromatography the protein obtained after several steps of purifications (see materials and methods) was applied to a Sephadex G-150 column (2 x 40 cm) and eluted with Na-phosphate buffer (pH 7.2). The enzyme obtained after Gel chromatography ($V_e = 116\text{ml}$) to a CM-cellulose column (1 x 18 cm) equilibrated with 5 mM Tris-HCl, pH 7.5, eluted with a KCl concentration gradient.

Total polyamines quantity compared with standard is increased by 42.5%, 54.5% and 76.8%, respectively in I, II and III stages of prostate cancer, and 59.5%, 64.8% and 87.9%, respectively in I, II and III stages of bladder cancer (Fig. 3 and Table 2). The increase of polyamines quantity coincides with the increase of arginase activity, what shows the correlation between them during the disease.

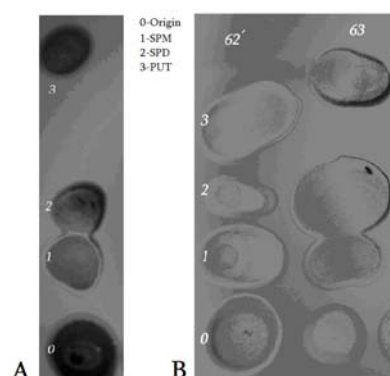


Fig. 3. Quantitative and qualitative analysis of blood serum polyamines of a healthy (A), prostate and bladder (B) cancer patients (A, $R_{\text{SPM}} = 0.29$, $R_{\text{SPD}} = 0.45$, $R_{\text{PUT}} = 0.82$); B: 62'- bladder (stag II), 63-prostate (stage II), 62'- $R_{\text{SPM}}=0.32$, $R_{\text{SPD}}=0.48$, $R_{\text{PUT}}=0.68$; 63- $R_{\text{SPM}}=0.33$, $R_{\text{SPD}}=0.45$, $R_{\text{PUT}}=0.76$ ($n=7$, $p<0,05$, PUT – putrescine, SPD – spermidine, SPM - spermine).

Table 2. The change of polyamines quantity in blood serum during different stage of prostate and bladder cancers (n=10, p<0.001).

Stage of cancer	Polyamine	nM Polyamine/ml serum	
		Bladder	Prostate
Norm	PUT	10.2±0.23	
	SPD	8.6±0.14	
	SPM	15.3±1.4	
I	PUT	17.4±1.1	15.7±1.5
	SPD	18.4±1.6	15.6±0.9
	SPM	18.6±1.8	17.3±0.8
II	PUT	17.9±1.3	16.4±1.3
	SPD	18.2±1.1	17.7±1.1
	SPM	20.1±1.9	18.6±1.3
III	PUT	18.4±1.1	17.3±1.1
	SPD	21.9±1.9	20.2±1.9
	SPM	23.8±1.2	22.8±1.2

Our results have shown, that the quantity of nitrite anions was increased by 125% in stage II prostate and bladder cancers patients blood serum (Fig. 4). It indicates the acceleration of metabolism as a result of disease, because a large amount of a building material is needed, and polyamines and NO are essential factor for tumor growth.

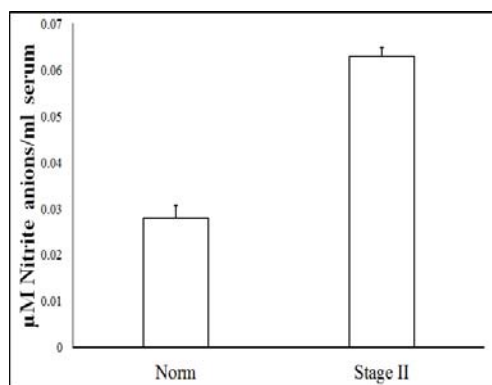


Fig. 4. The change of nitrite anions quantity in blood serum of prostate and bladder cancer patients of stage II (n=7 for norm, n=11 for cancer of stage II, p<0.05).

Analyzed results show that arginase activity, polyamines and NO quantity are significantly increased during prostate and bladder malignant cancers and that this increase is in correlation with the cancer stages. So, we can draw a conclusion that arginase and NO-synthase (NOS) are the important partakers of cancerogenesis and can be considered as an important diagnostic and treatment tools for cancer development. The practical importance of our work is through the change of arginase and NOS activity, we can influence on polyamines and NO quantity, thus influencing on cancer cell's metabolism.

The feature of the arginase and NOS family that makes them attractive as therapeutic targets is that there are a host of small molecules that inhibit these enzymes [7, 10]. Since

modern medicine has no effective cure for the malignant cancers and tumors, scientists are interested in finding a potent agent with non-cytotoxic properties. We suggest that arginase and NOS inhibition may have some antitumor effects on the cancer development as it inhibits polyamines and NO levels, precursor of cancer cell proliferation, tumor angiogenesis and metastasis. Our results can be as a base to use this model for the study of other inhibitors of arginase and NOS for the determination of productive and non-cytotoxic antitumor concentration. The inhibitors of arginase and NOS will allow changing the course of cancer development. Taking into account the above mentioned, in our next project we will research the anti-tumor potential of the arginase and NOS activity inhibition by nor-NOHA (N^ω-hydroxy-nor-Arginine), L-NAME (L-N^G-Nitroarginine methyl ester) and mixed, administered for 5 weeks against 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)-induced mammary carcinogenesis in rats.

Acknowledgments

We would like to thank the National Center of Oncology named after V.A. Fanarjyan and especially Dr. Knarik Aleksanyan for providing cancer serum specimens for our research. This work was supported by the State Committee of Science, Ministry of Education and Science of Armenia, in the frames of the research project № 16YR-1F023.

References

1. Avtandilyan N., Karapetyan S., Aleksanyan K. (2016) The relationship between arginase activity and change of polyamines quantity in human blood serum during breast cancer. *Biolog. J. Armenia*, 2(68),92-99.
2. Bonavida B. (2015) Nitric oxide and cancer: pathogenesis and therapy. Springer Intern. Publ. Switzerland.
3. Kuniyasu S. (2011) The mechanisms by which polyamines accelerate tumor spread. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 30:95.
4. Morgan D. (1998) Methods in Molecular Biology, Polyamine Protocols. Vol. 79, IX, 186 p. A product of Humana Press.
5. Morris S. (2012) Arginases and arginine deficiency syndromes. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 15, 64–70.
6. Munder M. (2009) Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. *British J. Pharmacol.*, 158, 638–651.
7. Pokrovskiy M. (2011) Arginase inhibitor in the pharmacological correction of endothelial dysfunction. *Int. J. Hypertension*, ID 515047.
8. Porembska Z., Luboiński G., Chrzanowska A., Mielczarek M., Magnuska J., Barańczyk-Kuźma A. (2003) Arginase in patients with breast cancer. *Clin. Chim. Acta*, 328, 105-111.
9. Rodríguez P., Ochoa A. (2008) Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunol. Rev.*, 222, 180–191.
10. Stepan J., Nyhan D., Berkowitz D. (2013) Development of novel arginase inhibitors for therapy of endothelial dysfunction. *Frontiers in Immunol.* 4, Article 278.
11. Vodovotz Y. (1996) Modified microassay for serum nitrite and nitrate. *Biotechniques*, 394, 20: 390–392.
12. Wright H., Simonsen K., Cheng Y. (2014) High breast cancer-related mortality in Armenia: Examining the breast cancer knowledge gap. *The Mount Sinai J. Medicine*, 3(80), 230.

ANTIOXIDANT PROPERTIES OF STEVIA (*STEVIA REDAUDIANA BERTONI*) DURING IMMOBILIZATION STRESS

H. KARAPETYAN, E. BARSEGHYAN, A. TRCHOUNIAN

Yerevan State University, Department of biochemistry, microbiology and biotechnology
hkarapetyan@ysu.am

The changes of antioxidant enzymes – catalase and peroxidase activity and lipid superoxide oxidation processes in rabbit blood have been determined in conditions of immobilization stress long duration. It was also studied stevia (*Stevia rebaudiana Bertoni*) effect on oxidant and antioxidant systems. It was revealed that with stress effect duration lengthening fat superoxide oxidation processes is activated and malonic dialdehyde amount is increased. It was shown that antioxidants contained in stevia suppress oxidation processes providing preservation of activity of antioxidant enzymes in blood. It can be suggested that stevia leaves antioxidant properties are a measure of correction of immobilization stress results.

Immobilization stress – stevia-malonic dialdehyde-catalase

Ուսումնասիրվել է ճագարի արյան մեջ լիպիդների գերօքսիդային օքսիդացման գործընթացների և հակաօքսիդանտային ֆերմենտների կատալազի և պերօքսիդազի ակտիվության փոփոխությունների օրինաչափությունները անշարժացնող սթրեսի երկարատև ազդեցության պայմաններում, ինչպես նաև հետազոտվել է մեղրախոտի (*Stevia rebaudiana Bertoni*) ազդեցությունն այդ գործընթացների վրա: Ցուց է տրվել, որ սթրեսի ազդեցության տևողության երկարացմանը զուգընթաց ճագարի արյան մեջ խթանվում են ճարպերի գերօքսիդային օքսիդացման գործընթացները, ինչի հետևանքով բարձրանում է մալոնային երկալդեհիդի քանակը, իսկ մեղրախոտում պարունակվող հակաօքսիդանտային հատկություն ունեցող նյութերը ճնշում են օքսիդացման գործընթացները՝ օժանդակելով արյան մեջ հակաօքսիդանտային ֆերմենտների ակտիվության պահպանմանը: Առաջարկվում է մեղրախոտի տերևների հակաօքսիդանտային հատկությունները կիրառել որպես անշարժացնող սթրեսի հետևանքները շտկող միջոց:

Անշարժացնող սթրես-մեղրախոտ-մալոնային երկալդեհիդ-կատալազ

Изучены закономерности изменения процессов перекисного окисления липидов и активности антиоксидантных ферментов каталазы и пероксидазы в крови кроликов в условиях длительного воздействия иммобилизационного стресса. Также было исследовано влияние антиоксидантных соединений листьев стевии (*Stevia rebaudiana Bertoni*) на эти процессы. Показано, что после длительного воздействия стресса в крови у кроликов активируются процессы перекисного окисления липидов и повышается количество малонового диальдегида. Антиоксидантные вещества, содержащиеся в листьях хстевии, подавляли окислительные процессы, тем самым содействуя сохранению активности антиоксидантных ферментов. Предлагается, антиоксидантные свойства листьев стевии использовать как меру коррекции последствий иммобилизационного стресса.

Иммобилизационный стресс-стевия – малоновый диальдегид-каталаза

Treatment of organism resistance effective measures to different stress factors is one of actual problems of medico-biological sciences, since the stress is a basis for development of numerous pathological processes. In the beginning state of the effect of stress factors, hypothalamus-hypophysis-adrenal system is stimulated, the amount of biologically active compounds in organism enhances, the level of red-ox processes changes that play an important role in organism adaptation to environment altered conditions and viability providing. Nowadays sharp change of human lifestyle results in motor activity confinement, and organism natural viability is possible only at sufficient motor background which makes a favorable impact on natural processing of organism physiological functions;

especially the investigation of physico-emotional stresses, including immobility becomes relevant.

In the case of influence of different stressful irritants superoxide oxidation processes of lipids strengthen, amount of intermediate and final products of these reactions increases in blood plasma which cause structural and functional distortions of different organs and tissues [3,4]. To confine these pathologies the important role belongs to antioxidant enzymes of organs and tissues (catalase, superoxide-dismutase, glutathione-peroxidase) which are the first ring of intracellular defensive mechanisms against free radicals. The effect of stressful irritants is accompanied by deviation of the equilibrium between free radical processes and organism antioxidant system [2]. From this point of view the studies directed to the revelation of different preparations possessing antioxidant property are considered to be quite actual topic. Among plants containing anti oxidant compounds it should be mentioned the stevia which contains flavonoids and glycosides (*Stevia rebaudiana Bertoni*). This herb is known due to its anti-inflammation, anti-sclerotic, anti-allergic, bactericide and anti-histamine effects and is applied as medico-preventive measure [10, 12].

Taking into account the role of antioxidant system enzymes in regulation of free radical processes, we have had a task to study regularities of lipid superoxide oxidation and antioxidant system activity changes in combined effect dynamics of stevia and immobilization stress in rabbit blood.

Materials and methods

Studies have been carried out on 10 rabbits with the same sex, weight in the same feeding and caring conditions by two variants. In the first variant the changes of lipid superoxide oxidation processes and activity of enzymes (catalase and peroxidase) were studied in immobilization stress effect (control group). For immobilizing of animals they were fixed 5 hours a day during 30 days on the experimental table. In the second variant the studies were carried out in combined stress dynamics of stevia and immobilization stress. Stevia crushed leaves with 0.5 g/kg weight were added to animal feed each day then animals were exposed to stress effect. Studies in rabbit blood were realized in norm, after immediate stress direct effect, then one time per 5 days during 30 days.

Catalase activity was determined by manganese-metric method, peroxidase activity – by spectrophotometric method [5].

Results and discussion

In the first state of studies the changes of malonic dialdehyde amount as well as catalase and peroxidase activities in rabbit blood were carried out in immobilization stress effect dynamics. It follows from analysis of the results that in early stress state for animals exposed to immobilization stress effect the amount increasing of malonic dialdehyde being final product of lipid superoxide oxidation is observed (Fig. 1). After 5 hours of stress effect the amount of malonic dialdehyde increased by 160%, after 5 days – 106%, in 20th day – 119%, then it begins to decrease then in 30th day the amount of malonic dialdehyde was higher by 41% as compared to norm.

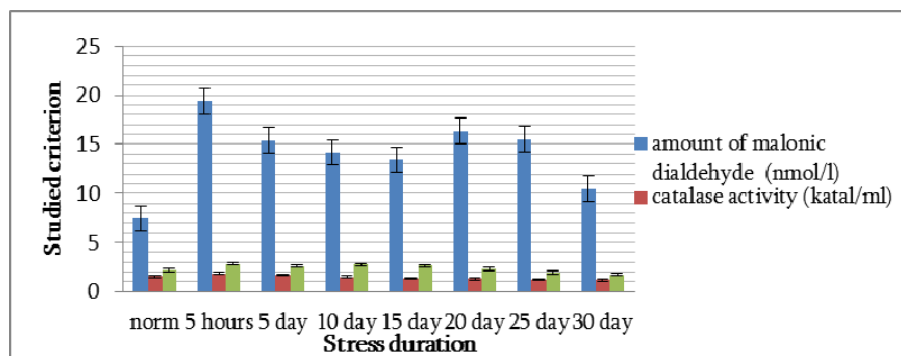


Figure 1. Immobilization stress effect on malonic dialdehyde amount, catalase and peroxidase activities in rabbit blood.

As far as the activity of antioxidant enzymes is concerned after 5 hours from the stress effect, the catalase activity increases by 21 % as compared to the norm, and after 5 days – by 10%. Catalase activity increasing at the early stages of different stress factor effect was mentioned by other authors as well [6, 11]. With stress effect influence enhancement in chronic stage the catalase activity gradually decreases. In 15th day its activity decreases by 11% compared to the norm, in 20th day – by 16%, 25th day – 20%, 30th day – 22%.

As it follows from the figure 1, regularities of the peroxidase activity change depending on stress effect duration are preserved as in the case of catalase; if only catalase activity begins to decrease in 15th day after stress exposure, the peroxidase activity decreases in 25th day compared to the norm.

Concluding the results of this stage it is obvious that with stress duration enhancement the intensity of lipid superoxide oxidation remains higher from the norm even in the 30th day of stress effect, but the activity of antioxidant enzymes in stress early stages rises, in chronic stage – decreases from the norm.

Literature review showed that according to the some authors at immobilization stress long duration, lipase, phospholipase are activated by catecholamines and glucocorticoids that strengthen fat superoxide oxidation processes. The result of this is that the enhancement of superoxide oxidation product density suppresses the activity of antioxidant enzyme activity [4,6]. It is also known that in conditions of oxidative stress or oxygen active form formation a distortion of antioxidant system enzyme functions can occur [9].

As it was mentioned, antioxidant enzymes are the first area of intracellular defense against free radicals and belong to peripheral stress confining system. Hence the strengthening of organism antioxidant power should contribute to increasing of activity of the mentioned enzymes. Taking all these into consideration in the next stage of experiments the changes of antioxidant enzyme activities and lipid superoxide oxidation in blood of animals exposed to stress and fed by food enriched by stevia leaves that in turn are enriched by antioxidant have been studied.

As it is obvious from Fig. 2, in blood of animals fed by stevia and exposed to stress during 5 hours the malonic dialdehyde amount increases by 148%, after 5 days of stevia receiving and stress exposure – by 49%, in 10th day – 13%, and with stress duration lengthening it starts gradually decreasing in such way that in 30th day it is lower by 26% than the norm. What concerns to antioxidant enzymes in dynamics of stevia and immobilization stress combined effect the catalase activity does not decrease, vice versa the activity gradual increase is observed and in 30th day it is higher by 13% than the norm. Higher criterion is observed in 20th day – by 118%. Similar regularities are observed at studying of peroxidase activities.

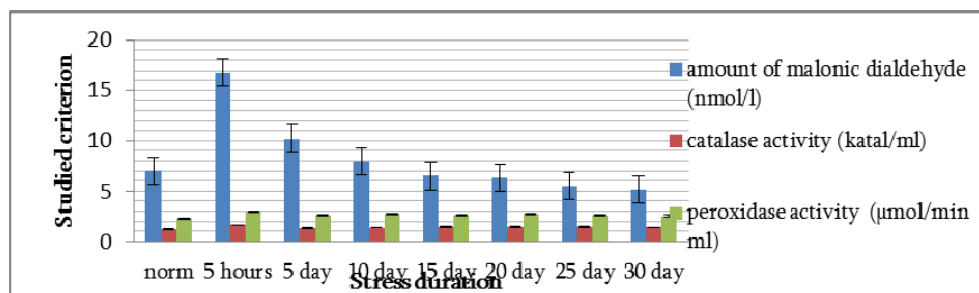


Figure 2. Combined effect of immobilization stress and stevia (*Stevia rebaudiana Bertoni*) on malonic dialdehyde amount, catalase and peroxidase activities in rabbit blood.

The obtained results can be explained by suppressing effect of natural antioxidant compounds contained in stevia leaves on fat superoxide oxidation processes preventing the performance of inhibiting effect of their products on antioxidant enzyme activities [1].

It was shown the antioxidant effect of tea plant *Echinodorus grandiflorus* on rabbit by other authors. It was revealed that tea preparations prevent stimulated damaging of lipids and proteins by sodium aside as well as contribute to restoration of antioxidant enzymes – catalase and superoxide-dismutase [7]. It was also shown that flax seedling polyphenols and omega-3 fat-acids decrease chronic stress effect in rabbits [8].

Therefore, it might be concluded that in stevia (*Stevia rebaudiana Bertoni*) leaves antioxidant compounds can be a measure of correction of immobilization stress results.

References

1. Che Y., Zhou Z., Shu Y., Zhai C., Zhu Y., Gong S., Cui Y., Wang JF., Chronic unpredictable stress impairs endogenous antioxidant defense in rat brain. //J Neulet 2014, 584: p. 208-13
2. Cline BH, Anthony DC, Lysko A, Dolgov O, Anokhin K, Schroeter C, Malin D, Kubatiev A, Steinbusch HW, Lesch KP, Strekalova T. Lasting downregulation of the lipid peroxidation enzymes in the prefrontal cortex of mice susceptible to stress-induced anhedonia//J Behav Brain Res. 2015; 276:118.
3. Koshoridze N.I., Menabde K.O., Kuchukashvili Z.T., Chachua M.V., Chipashvili M.D. Quantitative alterations in the products of lipid peroxidation under stress //J Stress Physiol. Biochem., 2010; 6: 4-9.
4. Kuchukashvili Z, Menabde K, Chachua M, Burjanadze G, Chipashvili M, Koshoridze N. Functional state of rat cardiomyocytes and blood antioxidant system under psycho-emotional stress //Acta Biochim. Biophys. Sin. 2011; 43(6): 480-486,
5. Kukulyanskaya T.A. Enzymology //Minsk: Belorussian State Univ. Press, 2008. 49 p.
6. LatyushinYa.V., Pavlova V.I., KamskovaYu.G., Saraykin D.A. Influence of ceruloplasmin on dynamics of lipid peroxidation and on antioxidant system activity in thymus tissue at hypokinetic stress// Bulletin of the South Ural State University Series "Education, Healthcare Service, Physical Education" 2014, vol. 14, no. 1, pp. 30–33 (In Russian)
7. Lunardi RF, Wohlenberg M, Medeiros N, Agostini F, Funchal C, Dani In vitro antioxidant capacity of tea of *Echinodorus grandiflorus*, "leather hat " in Wistar rat liver. An Acad Bras Cienc. 2014; 86(3):1451-62.
8. Naveen S, Siddalingaswamy M, Singsit D, Khanum F Anti-depressive effect of polyphenols and omega-3 fatty acid from pomegranate peel and flax seed in mice exposed to chronic mild stress // Psychiatry Clin. Neurosci. 2013; 67(7):501-8.
9. Ryazantseva L.T. Enzymes-antioxidants: structurally functional properties and a role in regulation of metabolic processes // Proceedings of Voronezh state university, 2011. vol. 7. № 2. pp. 126–129 (In Russian).

10. Shivanna N, Naika M, Khanum F, Kaul VK. Antioxidant, anti-diabetic and renal protective properties of *Stevia rebaudiana*. J Diabetes Complications. 2013;27(2):103-113
11. Solin A.V., Korozin V., Lyashev Y.D. Hepatoprotective effect of regulatory peptides during immobilization stress // Scientific Proceedings of Belgorod State University. 2012, N 22 (141), p. 123-126 (In Russian).
12. Soufi S, D'Urso G, Pizza C, Rezgui S, Bettaieb T, Montoro P. Steviolglycoside targeted analysis in leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) from plants cultivated under chilling stress conditions // Food Chem 2016;190:572-58.

Biol. Journal of Armenia, 1 (69), 2017

17 β -ESTRADIOL ATTENUATES THE LPS-INDUCED INFLAMMATORY RESPONSE IN WHOLE BLOOD CELLS CULTURE

MARTIROSYAN ANUSH

*Institute of Molecular Biology, NAN RA, Laboratory of Molecular and Cellular Immunology
anushmart@gmail.com*

Estradiol belongs to a family of steroid hormones that primarily controls the reproductive system. 17 β -estradiol (E2) is the predominant and most biologically active estrogen. Growing evidences suggest that E2 may have a regulatory effects on immune system and can directly influence the function if cell-mediated immunity. Nevertheless, the effect of E2 on innate immune cells, particularly monocytes and neutrophils, has been so far poorly investigated. This study was aimed to investigate *in vitro* production of TNF- α , IL-1 β , MCP-1 and IL-8 by whole blood cells following short-term exposure (4 hours) to 17 β -estradiol (E2) in the presence or absence of LPS. The impact of E2 on β 2 integrin (CD11b/CD18) and L-selectin (CD62L) expression on the surface of human blood monocytes and neutrophils was also evaluated. We demonstrated an inhibitory effect of E2 on LPS-induced TNF- α production, the feature that could play a critical role in the regulation of inflammatory response. Expression of CD62L on neutrophils and monocytes was also decreased in the presence of E2. Thus, the results of our study indicate that E2 may have an immunomodulatory action on innate immune cells and modulate ongoing inflammatory response.

Neutrophils, monocytes, estradiol, gene expression, cytokines

Էստրադիոլը պատկանում է ստերոիդային հորմոնների ընտանիքին, որի առանցքային դերը վերաբարդողական համակարգի աշխատանքի կարգավորումն է: Էստրոգեն հորմոնի հիմնական և կենսաբանորեն առավել ակտիվ ձևը հանդիսանում է 17 β էստրադիոլը (E2): Մի շարք հետազոտություններ ցույց են տվել, որ E2-ն կարող է ունենալ կարգավորիչ ազդեցություն իմունային համակարգի վրա և անմիջականորեն ազդել բջջային միջնորդավորված իմունային պատասխանի վրա: Այնուամենայնիվ, մինչ օրս, բնածին իմունային բջիջների՝ մասնավորապես մոնոցիտների և նեյտրոֆիլների վրա E2-ի ազդեցությունը բավականաչափ ուսումնասիրված չէ: Տվյալ հետազոտության նպատակն է ուսումնասիրել *in vitro* պայմաններում ամբողջական արյան բջիջների կողմից TNF- α , IL-1 β , MCP-1 և IL-8 արտադրելու ունակությունը 17 β -էստրադիոլի (E2) կարճատև ազդեցությունից հետո (4 ժ)՝ LPS-ի առկայության կամ բացակայության պայմաններում: Ինչպես նաև ուսումնասիրվել է E2-ի ազդեցությունը մոնոցիտների և նեյտրոֆիլների մակերեսային մոլեկուլներ β 2 ինտեգրինի (CD11b/CD18) և L սեյկտինի (CD62L) էքսպրեսիայի վրա: Մեր կողմից ցույց է տրվել E2-ն ցուցաբերում է ճնշիչ ազդեցություն LPS-ով խթանված TNF- α -ի արտադրության վրա, ինչը, հնարավոր է, կարող է որոշիչ դեր ունենալ բորբոքային պատասխանի կարգավորման ժամանակ: E2-ի ազդեցությունից հետո նեյտրոֆիլներում և մոնոցիտներում նվազում է նաև CD62L-ի էքսպրեսիայի մակարդակը: Այսպիսով, ստացված արդյունքները ցույց են տալիս, որ բնածին իմունային բջիջներում E2-ն կարող է ունենալ իմունոկարգավորիչ ազդեցություն և modulate ընթացիկ իմունային պատասխանը:

Նեյտրոֆիլներ, մոնոցիտներ, Էստրադիոլ, գենային էքսպրեսիա, ցիտոկիններ

Эстрадиол относится к группе стероидных гормонов, которые главным образом контролируют репродуктивную систему. 17 β -эстрадиол (E2) является одним из основных и наиболее биологически активных эстрогенов. Накопленные свидетельства указывают на то, что E2 способен оказывать регуляторный эффект на иммунную систему и способен непосредственно воздействовать на функционирование клеточного звена иммунитета. Тем не менее, воздействие E2 на клетки врожденного иммунитета, в частности моноциты и нейтрофилы остается плохо изученным. Таким образом, целью данного исследования явилось изучение *in vitro* продукции TNF- α , IL-1 β , MCP-1 и IL-8 клетками цельной крови после кратковременного (4 часа) воздействия 17 β -эстрадиола (E2) в присутствии или отсутствии LPS. Кроме того была проведена оценка воздействия E2 на экспрессию β 2 интегрина (CD11b/CD18) и L-селектина (CD62L) на поверхности моноцитов и нейтрофилов крови человека. Нами был продемонстрирован ингибиторный эффект E2 на LPS-индуцированную продукцию TNF- α , особенность/свойство которая может играть критическую роль в регуляции воспалительного ответа. Экспрессия CD62L на нейтрофилах и моноцитах так же была снижена в присутствии E2. Таким образом, результаты нашего исследования указывают на то, что E2 может иметь иммуномодуляторное воздействие на клетки врожденного иммунитета и способен модулировать развитие воспалительной реакции.

нейтрофилы, моноциты, эстрадиол, генная экспрессия, цитокины

Hormones are chemical messengers secreted by endocrine glands that regulate numerous biologic processes, including growth and development, reproduction, immunity and homeostasis. The link between immune and endocrine systems is being increasingly recognized. The regulation of this well-balanced machinery occurs through interactions of hormones with receptors on immune cells which modulate immune cell response and function. Various observations suggest that sex hormones may not only simply affect the immune responses but may also predispose persons to allergies and autoimmune diseases [1]. It was suggested that high incidence and prevalence rates of autoimmune diseases in women could be associated with the hormonal fluctuations to which they are exposed throughout life [1]. Particularly, it was shown that estrogen (or 17 β -estradiol) can broadly affect innate and adaptive immune processes through estrogen receptors expressed on most immune cells. Despite many known links between E2 and immune function, the exact role of this hormone in inflammation is controversial. While pro-inflammatory features of 17 β -estradiol were previously reported [2], recent evidences suggested anti-inflammatory effect of E2 [3]. This study was aimed to analyze the production of TNF- α , IL-1 β , MCP-1 and IL-8 by whole blood cells and determine the expression of β ₂ integrin and L-selectin on monocytes and neutrophils from healthy subjects after E2 exposure in the presence or absence of LPS.

Materials and methods

Sampling. The study was approved by the Ethical Committee of the Institute of Molecular Biology of the NAS RA (IRB IORG0003427). Venous blood samples were obtained from 12 healthy women (mean age of 33 $\pm$ 3,4 years). None of the selected donors was taking any medication at the time of the experiments, or suffered from acute/chronic diseases. Blood of selected women was collected in the mid follicular phase to minimize diversity of estrogen levels in the blood.

In vitro stimulation of whole blood with E2 and LPS. Peripheral blood samples was collected in EDTA tubes, and diluted 1:10 with RPMI-1640 medium (Gibco) containing 10% fetal calf serum (FCS) and 2 mM L-glutamine (Sigma). The blood was distributed in 24-well plates and stimulated with E2 (100 μ M) in the presence or absence of LPS (100 ng/ml) for 4 hours at 37°C.

Cytokine measurements. Cytokine content in supernatants was measured with specific immunoassays according to the manufacturer's instructions. Cytokine production was analyzed using Human IL-1 β , IL-8, TNF- α and MCP-1 ELISA MAX Deluxe kits

(Biolegend, UK). The samples were read at 450 nm in a 96-well plate reader (HumaReader HS, Human Diagnostics Worldwide, Germany).

Flow cytometric analysis. At the end of stimulations, cells were harvested and incubated with fluorescent mAb toward CD14, CD16, CD11b, CD18, and CD62L for 30 minutes. Labeled cells, after further washing, were resuspended in PBS supplemented with 1% BSA. Antigen expression was analyzed on a Partec CyFlow Space (Partec, Germany). 10 000 events were collected from each sample.

Statistics. Statistical analyses were carried out using the Statsoft Statistica package (<http://www.statsoft.com>). All values are given as means $\pm$ standard errors of the means. For continuous variables, groups were compared using the paired Student's t-test. *P* values ≤ 0.05 were considered as significant.

Results

Effect of E2 and LPS on surface expression of CD11b, CD18, and CD62L. In neutrophils, LPS significantly enhanced membrane expression of CD11b/CD18 ($P < 0.01$). In monocytes, LPS exposure resulted in increased CD11b surface expression ($P < 0.05$). Expression of CD62L on neutrophils were suppressed by LPS ($P < 0.05$), while in monocytes the level of CD62L remained unchanged after exposure to LPS. Presence of E2 did not substantially affected LPS-induced expression of surface CD11b, CD18 or CD62L on both cell populations. In absence of LPS, E2 administration significantly suppressed cell-surface expression of CD62L on both monocytes and neutrophils ($P < 0.05$) (Figure 1).

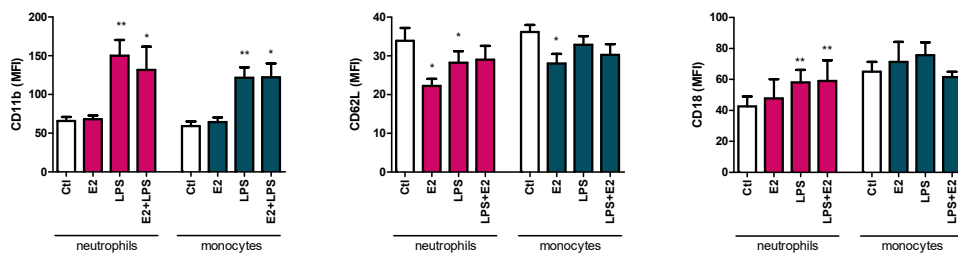


Figure 1. Effect of E2 (100 μ M) and LPS (100 ng/ml) on expression CD11b, CD62L, and CD18 surface markers in neutrophils and monocytes from lysed whole blood. Data represented as mean fluorescence intensity (MFI) $\pm$ S.E.M. Neutrophils were identified according to FSC/SSC gate and showing CD16^{bright} and CD14⁻ staining. Monocytes were identified according to FSC/SSC gate and showing CD14⁺ staining. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with the untreated control group (Ctl).

Cytokine production by whole blood cells in the presence of E2 and LPS. A low level of constitutive IL-1 β , IL-8, TNF- α and MCP-1 was detected in supernatants from unstimulated control cells. Administration of endotoxin increased the levels of all tested cytokines in whole blood culture supernatants in comparison to unstimulated group (Figure 2).

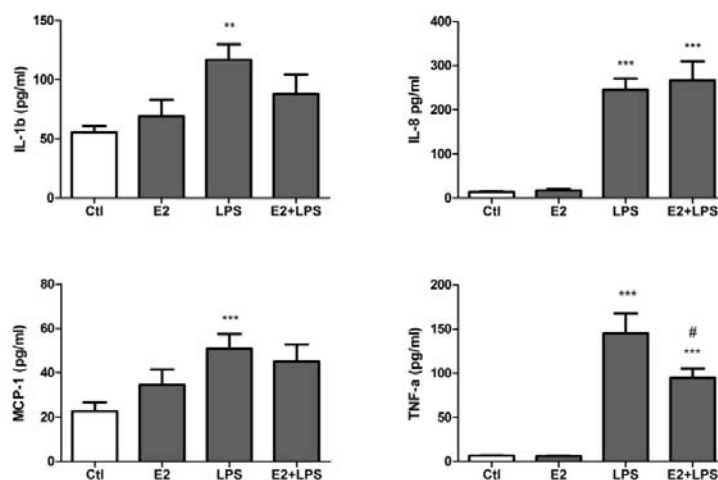


Figure 2. Effect of E2 (100 μ M) and LPS (100 ng/ml) on the production of IL-1 β , IL-8, TNF- α and MCP-1. Data are presented as means $\pm$ S.E.M. ** P < 0.01, *** P < 0.001 compared with the untreated control group (Ctl), # P < 0.05 compared with the LPS exposure.

Treatment of cells with E2 had no significant effect on production of all studied cytokines. E2 exposure had an inhibitory effect on LPS-induced production of TNF- α (P < 0.05) (Figure 2).

Discussion

In the present study we investigated immunomodulatory properties of primary female hormone 17 β -estradiol and its role in LPS-mediated innate immune response. We observed a modulatory effect of E2 on neutrophils and monocyte-derived molecules which are involved in the regulation of inflammation. E2 did not affect cytokine production in cultures of whole blood cells, but notably suppressed LPS-induced TNF- α production. Besides, E2 administration diminished production of MCP-1 and IL-1 β in LPS-treated cells (albeit data is not significant). Available data in the literature concerning effect of estradiol on endotoxin-stimulated cells is highly controversial. Different research groups demonstrated that production of cytokine such as IL-1 β and IL-8 could be inhibited or even potentiated by E2, depending on experimental condition [2; 4; 5]. Our results suggest activation of adhesion properties of the cells by E2 as reflected by the decreased expression of CD62L (decrease in the expression of CD62L is due to shedding effect). Together these results indicate that under inflammatory condition E2 is capable of attenuating cytokine-mediated inflammatory responses of innate immune cells, presenting promising way to prevent excessive inflammation.

In conclusion, our experimental findings have provided additional evidence of the immunomodulatory properties of 17 β -estradiol which is of special importance for regulating aberrant immune responses during steady state and inflammation.

Funding

This study was supported by State Committee Science MES RA, in frame of the research project no. SCS 15T-1F213.

References

1. *Marriott I, Huet-Hudson YM*. Sexual dimorphism in innate immune responses to infectious organisms. *Immunol. Res.* 2006; 34: 177-192.

2. Bengtsson AK, Ryan EJ, Giordano D, Magaletti DM, Clark EA. 17 β -estradiol (E2) modulates cytokine and chemokine expression in human monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2004; 104: 1404-1410.
3. Tyagi AM, Srivastava K, Mansoori MN, Trivedi R, Chattopadhyay N, Singh D. Estrogen deficiency induces the differentiation of IL-17 secreting Th17 cells: a new candidate in the pathogenesis of osteoporosis. *PLoS One* 2012; 7: 44552.
4. Pioli PA, Weaver LK, Schaefer TM, Wright JA, Wira CR, Guyre PM. Lipopolysaccharide-induced IL-1 β production by human uterine macrophages up-regulates uterine epithelial cell expression of human β -defensin 2. *J. Immunol.* 2006; 176: 6647-6655.
5. Pioli PA, Jensen AL, Weaver LK, Amiel E, Shen Z, Shen L, Wira CR, Guyre PM. Estradiol attenuates lipopolysaccharide-induced CXC chemokine ligand 8 production by human peripheral blood monocytes. *J. Immunol.* 2007; 179: 6284-6290.
6. Miller AP, Feng W, Xing D, Weathington NM, Blalock JE, Chen YF, Oparil S. Estrogen modulates inflammatory mediator expression and neutrophil chemotaxis in injured arteries. *Circulation* 2004; 110: 1664-1669.

Biolog. Journal of Armenia, 1 (69), 2017

CRONIC ACOUSTIC STRESS AND α_2 -ADRENOBLOCKERS EFFECT ON OPEN FIELD ACTIVITY OF THE RAT

A.L. MANUKYAN

Department of Medical Chemistry YSMU after M. Heratsi

Open field, noise, α_2 -adrenoblockers, behavioral activity, stress

«Բաց դաշտ», աղմուկ, α_2 -ադրենաբլոկատորներ, վարքային ակտիվություն, սթրես

Открытое поле, шум, α_2 -адреноблокаторы, поведенческая активность, стресс

It is shown that among hazardous factors of the environment the high level of industrial, transport and community ambient noise are extremely dangerous, which drastically decrease the resistibility of an organism, promote different diseases development and particularly lead to the **Cognitive disorders**, affect learning, memory, perception, and the problem solving [20,15,17]. The latter is much likely to be associated with an increase of the stress hormone release and the oxidative stress (OS) development [1]. Epidemiological research provides the possibility of an integral risk estimation of community noise based directly on the empirical data gained under the genuine conditions of exposure, considering factors potent to amplify or attenuate the noise exerted effects [21].

The data obtained serve as evidence of the structural reorganization and the functional change of bio-membranes in experimental animals under the noise action due to lipid peroxidation (LPO) process activation and α -Tocopherol exhaustion in tissues and significant protective effects of antioxidants and the stress-limiting compounds, among which we consider adrenoblockers [14]. Our investigations have shown a harmful action of chronic noise on the protein oxidative modification processes intensity both in plasma and Erythrocyte Membranes and the modifying effects of α_2 -adrenoblockers on oxidative intensity, as well [14,22].

Considering all the above mentioned it is necessary to study effects related only to the noise influence in experiments, eliminating possibility of side effects.

Open field activity enables scientists evaluating locomotor behavioral activity, including the Total distance travelled, Average speed, Number of line crossings, Total

freezing episodes, Total time freezing, Average freezing score, Number of entries to the center zone, Time in the Center zone, Distance travelled in the Center zone, Corrected integrated path length for the Center zone, Time in the Periphery zone, Number of entries to the Periphery zone, Distance travelled in the Periphery zone, Time freezing in the Periphery zone, Corrected integrated path length for the Periphery zone was investigated first by Calvin Hall [9,10], who verified behavioral reaction of rodents by means of encountering defecation and urination.

The open field test nowadays is one of the most well-known manipulation in animal psychology [3,4,5,]. The open field activity of different variants are available for application - differing in shape of the environment (circular, square or rectangular), lighting (lighting from above with a bulb above the open field or lighting from underneath with a bulb placed under a transparent floor, usually red light is used), presence of objects within an arena such as platforms, columns, tunnels [18,19], etc. Taking into account existing data [16], the open field is a successful device for evaluating behavioral damage in animal under the noise. Researches conducted earlier have revealed that pre-exposure to moderately intense light and white noise facilitated open field activity measured by initial activity, lowered defecation scores, and supplementary measures (rearing, grooming, center field penetration) [12,16]. Ultimately, in the given research we applied the following 4 parameters: Total distance travelled, Average speed, Total freezing episodes, Number of entries to the center zone,

Materials and methods

Investigations were carried out on the white male rats weighing 150-200 g kept in ordinary vivarium conditions. The animals were divided into 4 groups: rats of the 1st group serve as a control, rats of the 2nd, 3rd and 4rd groups underwent 91 dB(A) noise influence with maximal energy in the region of average and high frequency; the duration of noise influence was 7, 30 and 60 days, each day 8hr noise exposition; animals of the 3rd group were injected Mesedin (10mg/kg) intraperitoneally, animals of the 4rd group were injected Beditin (2mg/kg) intraperitoneally, the first injection 12hr before the first exposition to noise action. Injections were repeated every 24 hr. Noise applied was obtained from the white noise generator joint with attenuator. The acoustic system supplied the reproduction in the range of 63-16000 Hz.

A square open field [6,11] is represented by the wooden square-shaped plate (60x60), in which in regular periods (6x6) 36 pits of 3.5 cm in diameter and of 2 cm in depth are done. From edges the plate was covered by the walls of 20 cm of height. The proximal 15 cm proximal to the edges of the arena were considered as "peripheral zone" and the central 30x30 cm area was considered as the "central zone". The rats were replaced in the middle of the plate, after which during 5 minutes the active dislocation time was recorded *t* (in seconds). The manipulation usually involved compelled confrontation of a rodent with the situation. The animal was placed in the center and the following behavioral items are recorded for a period ranging from 5 min: horizontal locomotion (number of crossings of the lines marked on the floor), frequency of rearing or leaning (sometimes termed vertical activity), grooming (protracted washing of the coat).

In given situation, rodents spontaneously preferred the periphery of the open field, then the central part, so that the rats moved close to the walls (thigmotaxis) [13]. The central part prevailing and spending time in the central part, as well as, decrease of the latency are considered to be indications of anxiolysis [7, 8].

Each trial was recorded for latter analysis, using a video camcorder positioned above the apparatus. Rats of line cross were obtained with an automated camera-based computer tracking system on a computer with the camera fixed to the ceiling, 2.1 m above the

apparatus. The research has been approved by Institutional Committee on Bioethics and corresponds to the principles of the Manual of Operation and use of the laboratory animals published by US NIH (№ 85-23, reconsidered in 1985).

Statistical analysis was made using BioStat. Significance of means' difference was evaluated using paired Student Newman – Keuls test (Anova). (p_1 - compare with control, p_2 - compare with noise).

Procedure

Rats were transferred to the test room from their home cages and were placed into the center or one of four corners of the open field and allowed to explore the apparatus for 5 minutes (Pic. 1). After the 5 minutes test, rats were returned in their home cages, after which the open field was cleaned with 70% ethyl alcohol and permitted to dry between tests.



Picture 1. Rat is placed into the center or one of four corners.

Results and discussion

Our results indicate the initial behavioral response to stress in an open field is activation. Chronic acoustic stress generally lowered open field activity [14] and prevented the activation effect, and that was restored by chronic injection of α_2 -adrenoblockers (Mesedin and Beditin).

Fig. 1 shows that the total distance travelled fragments in open field test under the acoustic stress conditions after 7, 30 and 60 days have different tendency of changes depending on the duration of experiment. Total distance travelled reports the total distance that the animal travelled during the test period [2].

Total distance travelled was significantly lower ($p < 0.001$) in the 2,3 and 4th compared to control groups after 7 days noise action. Administration of α_2 -adrenoblockers Mesedin and Beditin prior to noise action to the animals produced remarkable changes on the stress elicited activity and revealed noticeable regulatory effect on the open field activity after 30 ($p < 0.001$) and 60 ($p < 0.001$) days compared to the noise group.

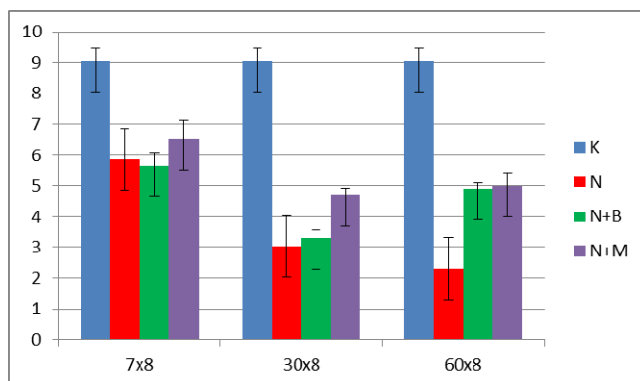


Fig 1. Total distance travelled (each group is of 6 animal, 8hr noise /day)

Average speed reports the average speed of the animal during a test. The result is the Total distance travelled during the period divided by the Test duration. Overall activity as well as the amount of time was measured with video-track in the open field (Pic. 2).

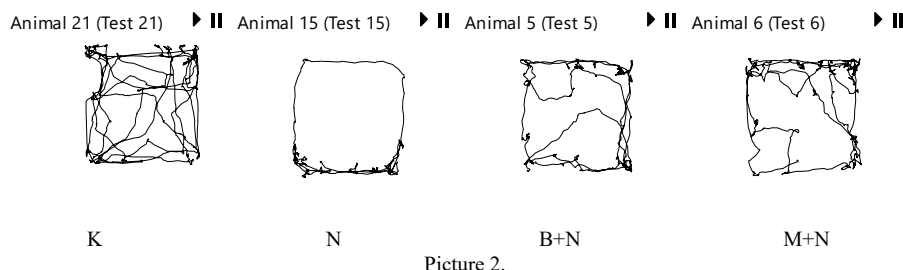


Fig. 2 shows average speed in open field test under the acoustic stress conditions after 7, 30 and 60 days. In rats, which were injected Mesedin the average speed was significantly higher ($p < 0.05$) than in the noise group, where average speed was significantly lower ($p < 0.001$) after 7 days. Yet, under the action of noise after 30 and 60 days the average speed of noise group became more lower ($p < 0.001$), compared to control group, but in the Beditin ($p = 0.001$) and Mesedin injected groups ($p < 0.001$) the average speed partially and significantly increased by influence of α_2 -adrenoblockers.

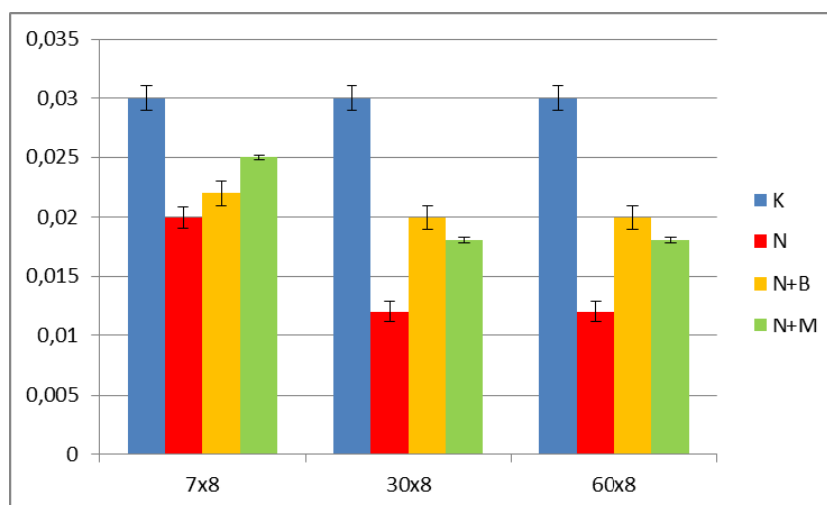


Fig 2. Average speed of animals under the noise action (n= 6, 8hr noise /day)

Behavioral and locomotive activity was also characterized by number of entries to the center zone as well and the locomotive activity of the rats also estimated by number of entries to the center zone. By their behavior rats in the open field prefer to be near to a protective wall, rather than exposed to danger out of the open, but a rival forage instinct will stimulate them to explore.

Fig. 3 shows number of entries to the center zone in the open field test under the experimental conditions. The noise action lead to the drastic decrease of entries to the center zone. Beditin injected animals also reveal the same tendency, entered less times into the center, what was less expressed compare for noise group ($p < 0.001$ in the noise group and

$p < 0.01$ in the Beditin group compare with control).

Rats of the Mesedin injected group reveal non-significant ($p = 0.26$) decrease of entries to the center zone. The same direction of changes observed after 30 and 60 days of noise action. Nevertheless the recovering effect of Mesedin was appeared after 30 and 60 days of noise action, where rats of the Mesedin group spent more time in the center (non significant, $p_1 = 0.56$),

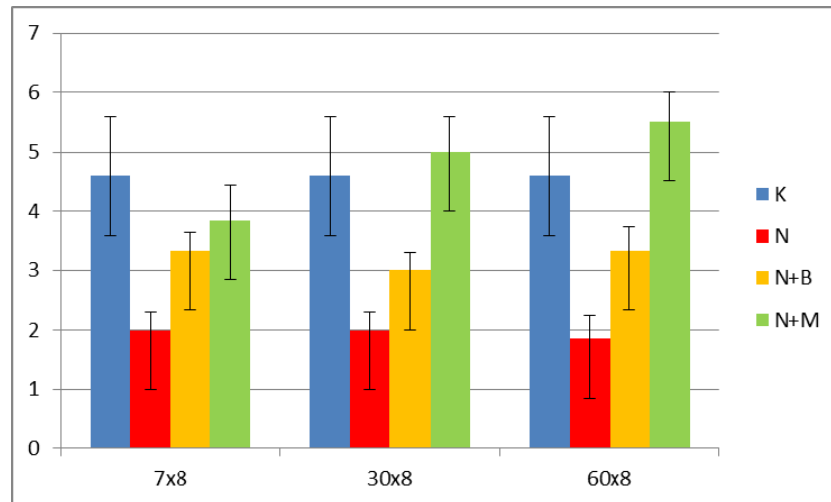


Fig 3. Number of entries to the center zone (each group is of 6 animal, 8hr noise /day) than the control rats.

Fig 4. shows significant differences across categories in number of entries to the center zone under the influence of Mesedin and Beditin. Rats of Mesedin group spent significantly more time in the center, then noise group after 7 days ($p_2 < 0.05$), 30 days ($p_2 < 0.01$) and 60 days action of noise. Moreover, after 60 days action of noise, there was significant ($p_2 < 0.05$) higher score across Beditin and noise group.

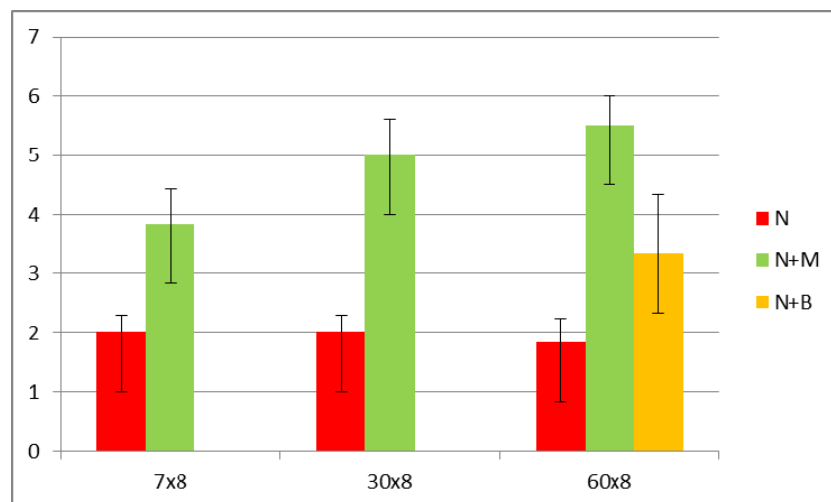


Fig 4. number of entries to the center zone across categories (each group is of 6 animals, 8hr noise /day)

Total freezing episodes reports the number of times the animal frozen during the test. The number of freezing episodes was encountered from the starting period of time [2]. For the control animals' a number of freezing episodes increases in the time.

Fig. 5 shows that total freezing episodes in open field test under the acoustic stress conditions after 7, 30 and 60 days have different direction of changes depending on the duration of experiment. The motor activity of 2nd group animals significantly decreased after 7 days of noise influence compared with the control group. An opposite direction of activity was observed after 4 weeks action of noise. The most interesting was the fact of restoring control level of studied parameter after 8 weeks, which could be evidence of adaptation reaction. This was partially and significantly ($p < 0.001$) restored by the Mesedin and Beditin effects after 7 days. The 30 days action of noise was of a particular interest, where chronic stress reduced basal activity and Total freezing episodes in open field was significantly ($p < 0.001$) increased in all three experimental groups. However, after 60 day's influence of noise action Total freezing episodes of the noise group no significantly ($p = 0.42$) decreased compared to the control group. Meanwhile a score of Total freezing episodes was significantly greater of Mesedin ($p < 0.001$) and Beditin ($p < 0.05$) injected groups, which was conditioned with restore effects of α_2 -adrenoblockers. These findings were justified statistically, and are presented in Fig 6, which shows significant ($p < 0.001$) differences between the groups (Noise and Mesedin) after 60 days influence of noise action.

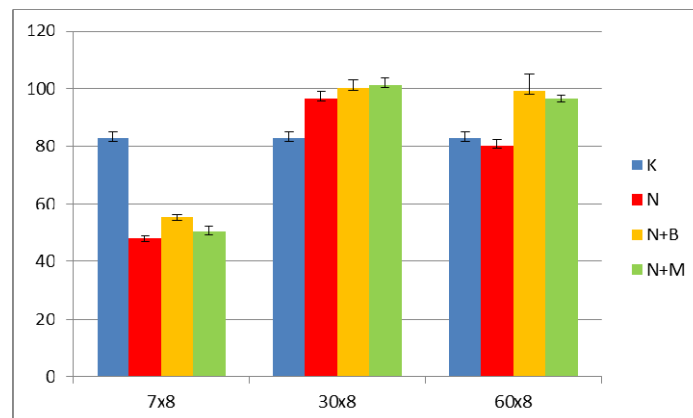


Fig 5. Total freezing episodes (each group 6 animal, 8 hr noise /day)

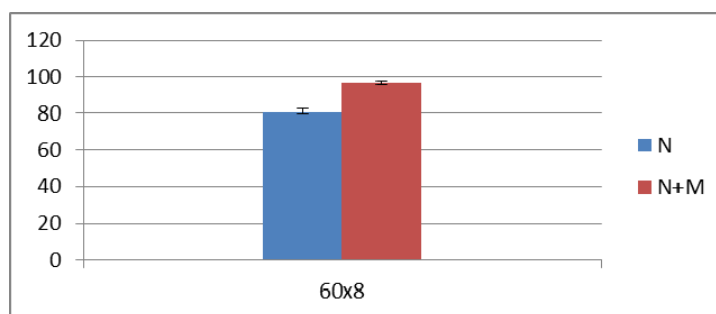


Fig 6. Total freezing episodes between the groups (each group 6 animal, 8hr noise /day)

Conclusion

In conclusion, chronic noise action decreases locomotor behavior and increases anxiety, intensity of which depend on the duration of noise action. Administration of α_2 -adrenoblockers Mesedin and Beditin to the animals reveals a regulatory effect under the chronic acoustic stress conditions, the efficiency of which depends both on the duration of noise action and the studied examples.

References

1. Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение) // Физиологические и клинико-биохимические аспекты. Из-во «Медицинская пресса». - 2006. - 400 с.
2. A detailed description of the ANY-maze measures. www.anymaze.com
3. Belzung, C., 1999. Measuring exploratory behavior. In: Crusio, W.E., Gerlai, R.T. (Eds.), Handbook of Molecular Genetic Techniques for Brain and Behavior Research (Techniques in the Behavioral and Neural Sciences). Elsevier, Amsterdam, pp. 739–749.
4. Belzung, C., 2001. Rodent models of anxiety-like behaviors: are they predictive for compounds acting via non-benzodiazepine mechanisms? Curr. Opin. Investig. Drugs 2, 1108–1111.
5. Blanchard, D. C., Griebel, G., Blanchard, R. J. 2001. Mouse defensive behaviors: Pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 25, 205-218.
6. Colombel C., Lalonde R., Caston J. The effects of unilateral removal of the cerebellar hemispheres on motor functions and weight gain in rats. // Brain Res. – 2002. – Vol.950. – P.231-238.
7. C. O. Nku1, G. O. Oghale1 and I. O. Ajiwhien. Locomotor Behaviour and Anxiety in the Open Field and Light/Dark Box in CD1 Mice Treated with Aspirin, Cataflam and Ethanolic Extract of Cannabis sativa // British Journal of Medicine & Medical Research 6(6): 563-572, 2015, Article no. BJMMR.2015.234 ISSN: 2231-061
8. D. A. Christakis, J. S. B. Ramirez & J. M. Ramirez. Overstimulation of newborn mice leads to behavioral differences and deficits in cognitive performance, 31 July 2012, SCIENTIFIC REPORTS | 2 :546| DOI:10.1038/srep00546.
9. Hall, C. S. (1934) Emotional behavior in the rat: Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. J. Comp. Psychol. 18:385-403.
10. Hall, C. S., E. L. Ballechey (1932) A study of the rat's behavior in a field: A contribution to method in comparative psychology. University of California, Publ. Psychol. 6: 1-12.
11. Jahkel, M., Rilke, O., Koch, R., Oehler, J. 2000. Open field locomotion and neurotransmission in mice evaluated by principal component factor analysis effects of housing condition, individual activity disposition and psychotropic drugs. Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry, 24, 6184.
12. Kevin A. Roth, Richard J. Katz. Stress, behavioral arousal, and open field activity A reexamination of emotionality in the rat. Neuroscience & Biobehavioral Reviews Volume 3, Issue 4, Winter 1979, p. 247–263.
13. Laetitia Prut, Catherine Belzung. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. European Journal of Pharmacology 463 (2003) 3–33.
14. Melkonyan M.M., Hunanyan L.S., Harutyunyan H.A., Grigoryan A.M., Tovmasyan N.V., Pogosyan G.A., Zakaryan G.V., Manukyan A.L. The effects of α_2 adrenoblockers on oxidation intensity in white rats blood under high level noise chronic action. The New Armenian Medical Journal, Vol. 9 (2015), No3 Supplement, p. 26.
15. Proceedings. The 9th Congress of the International commission on the biological effects of Noise. Noise as a Public Health Problem (ICBEN), Foxwoods, CT (2008)
16. R.J. Katz, K.A. Roth, B.J. Carroll, Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: Implications for a model of depression. Neuroscience & Biobehavioral Reviews Volume 5, Issue 2, Summer 1981, p. 247–251

17. Stansfeld S., Crombie R., Cardiovascular effects of environmental noise: Research in the United Kingdom. – Noise Health 13, 2011, pp. 229-233.
18. Takahashi, L.K., Kalin, N.H., 1989. Role of corticotropin-releasing factor in mediating the expression of defensive behavior. In: Blanchard, R.J., Brain, P.F., Blanchard, D.C., Parmigiani, S. (Eds.), *Ethoexperimental Approaches to the Study of Behavior*. NATO ASI Series. Kluwer Academic Publishing, Kluwer, Dordrecht, Boston, London, pp. 580–594.
19. Tatem K. S., Quinn, J. L., Phadke, A., Yu, Q., Gordish-Dressman, H., Nagaraju, K. Behavioral and Locomotor Measurements Using an Open Field Activity Monitoring System for Skeletal Muscle Diseases. *J. Vis. Exp.* (91), e 51785, doi:10.3791/51785 (2014).
20. W. Babish, “Health aspects of extra-aural noise research”, *Noise & health* 6, 69-81(2004)
21. Wright B, Peters E, Ettinger U, Kuipers E, Kumari V. Noise Health. Understanding noise stress-induced cognitive impairment in healthy adults and its implications for schizophrenia. 2014 May-Jun; 16(70): 166-76
22. Xu G, Zhang H, Zhang S, Fan X, Liu X. Plasma fibrinogen is associated with cognitive decline and risk for dementia in patients with mild cognitive impairment. *Int J. Clin. Pract.* 2008; 62: 1070–1075.

Biolog. Journal of Armenia, 1 (69), 2017

BIOTECHNOLOGY OF CITRIC ACID PRODUCTION FROM TOPINAMBUR

I.E. MELKUMYAN, R.S. HOVHANNISYAN

*Institute of Microbiology of SPC «Armbiotechnology» NAS of Armenia,
melk.77@mail.ru*

Citric acid is widely (75%) used in the food, drugs and chemicals productions. Commercially, citric acid is produced from molasses. However plant polyfructans such as inulin are not studied for production of citric acid point of view. Inulin contains 97% fructose and 3% glucose. Considerable amount of inulin contains the tubers of topinambur (*Helianthus tuberosus*) (20-25%). The main aim of present studies is the development of a new microbiological one stage technology with application of the new isolated original strains of fungi for the production of citric acid from a new raw material – topinambur. With this purpose the active strains from *Aspergillus* genera have been isolated. It was shown that indispensable condition for citric acid biosynthesis from inulin by microorganisms is the presence of their inulinase activity. The isolated and selected strains have inulinase activity. It was established that topinambur (inulin) is perspective source for production of citric acid.

Citric acid – inulin – bioconversion - topinambur

Կիտրոնաթթվի օգտագործումը (75%), ինչպես նաև դեղագործական և քիմիական արդյունաբերության մեջ: Հիմնականում այն արտադրվում է մելասսայից: Սակայն բուսական պոլիֆրուկտանները, օրինակ ինուլինը, գրեթե չեն ուսումնասիրվել կիտրոնաթթվի ստացման համար: Ինուլինը 97% ֆրուկտոզ և 3% գլյուկոզ պարունակող պոլիսախարիդ է: Ինուլինի զգալի քանակներ (20-25%) պարունակվում են գետնախնձորի պալարներում (*Helianthus tuberosus*): Ուսումնասիրությունների հիմնական նպատակն է մշակել միափուլ մանրէաբանական տեխնոլոգիա՝ նոր մեկուսացված բորբոսասնկի շտամների միջոցով գետնախնձորից (ինուլին) կիտրոնաթթվի արտադրության համար: Մեկուսացվել են *Aspergillus* ցեղին պատկանող բորբոսասնկի նոր շտամներ, որոնք օժտված են կիտրոնաթթվի սինթեզի ունակությամբ: Պարզվել է, որ ինուլինից կիտրոնաթթվի կենսասինթեզի համար անհրաժեշտ պայման է միկրոօրգանիզմներում ինուլինազային ակտիվության առկայությունը:

Պարզվել է, որ գետնախնձորի պալարները (ինուլին) հեռանկարային հումք են հանդիսանում կիտրոնաթթվի ստացման համար:

Կիտրոնաթթու – ինուլին – կենսակոնվերսիա - գետնախնձոր

Лимонная кислота широко (75%) используется в пищевой, а также в фармацевтической и химической промышленности. В основном она производится из мелассы. Однако растительные полифруктаны, например инулин, не изучены для производства лимонной кислоты. Инулин – это полисахарид, содержащий 97% фруктозы и 3% глюкозы. Значительное количество инулина содержится в клубнях топинамбура (*Helianthus tuberosus*) (20-25%). Основная цель исследований заключается в разработке новой микробиологической одноэтапной технологии с применением новых выделенных штаммов плесневых грибов для производства лимонной кислоты из топинамбура. С этой целью были выделены активные штаммы плесневых грибов рода *Aspergillus*. Показано, что необходимым условием для синтеза лимонной кислоты из инулина микроорганизмами является наличие инулиназной активности в них. Изучены особенности внеклеточной инулиназы и динамика биосинтеза лимонной кислоты в ходе культивации грибов, а также выполнены исследования по оптимизации условий. Показано, что топинамбур (инулин) является перспективным сырьем для производства лимонной кислоты.

Лимонная кислота – инулин – биоконверсия - топинамбур

The production of citric acid is one of the leading fields of applied microbiology. Citric acid is widely used in food (more than 75%), chemical, pharmaceutical industry, medicine and other industries. In the world about 12000000 tons of citric acid are produced annually [1-7]. Citric acid is widely distributed in the plant world. A significant amount of it contains citrus fruits, especially in Chinese magnolia vine, in pomegranate juice, lemon and others. At the beginning of the 20th century, plant resources were used for the production of citric acid as a raw materials. Currently, citric acid production is relieved by microbial synthesis. Commercially production of citric acid is produced from molasses. Various microorganisms, in particular fungi from the genera *Aspergillus*, *Penicillium*, yeast *Candida lipolitica*, *Yarrowia lipilitica* and others have rather high synthetic activity [8-12]. However, little is known about bioconversion of inulin (fructan) to citric acid. Inulin is widely distributed in the plants belonging to the families of *Compositae*, *Liliaceae* and *Gramineae*. Inulin is a polysaccharide, which contains 97% fructose and 3% glucose.

Inulin is widely distributed in plants, especially among the species of the family *Composite*, *Liliaceae* and *Graminae*. In particular, the considerable amount of inulin contains the tubers of topinambur (*Helianthus tuberosus*) (20-25%) and the roots of chicory. The tubers of topinambur also contain simple sugar (9-15%). Inulin draws great attention as a comparably cheaper raw-material for the production of fructose-glucose syrup, ethanol (especially as an alternative source of energy) and various oligofructans and other compounds [6].

The main aim of present report is the study of possibility of bioconversion of inulin into citric acid with application of the new isolated original strains of fungi as well as development approaches for one stage production of citric acid from a new raw material – topinambur (*Helianthus tuberosus*).

Materials and methods

Microorganisms strains of fungi capable of producing citric acid from inulin were isolated from rhizosphere soil of topinambur. For the isolation and screening of microorganisms capable to produce citric acid the Czapek agar medium was used (g/L) inulin as an only source of carbon 20, NaNO₃ -2.0, KH₂PO₄-1.0, MgSO₄· 7H₂O- 0.5, FeSO₄· 7H₂O- 0.001, KCl -0.5. The strains that displayed rapid growth on the mentioned medium have been isolated and identified as *Aspergillus niger* and selected for further studies. For studies of citric acid production the strains was cultivated in the same Czapek liquid medium.

Inulinase activity was measured in the reaction mixture consist of 3% of inulin in 0.05 M acetate buffer, pH 5.5 and 0.5 ml of enzyme solution. Incubation of reaction mixture was carried out at 45° C for 15 min. Reaction was stopped by boiling of mixture at 100° C. The

amount of reducing sugar was assayed by Somogy–Nelson method [7]. One unit of enzyme activity was defined as the amount of the formation of 1 μmol fructose/min at 45° C. Total sugar was measured by antron method [8].

The quality and quantity of citric acid was carried out by HPLC (Shimidzu LCsolution Analysis Report using for analysis of organic acids Shpdex RSpak KC-118, 300x8mm at 40°C, injection amount 10mkl) and titration methods [9].

Biomass was determined after collection by filtration, washing and drying at 105° C.

The extract from well crushed tubers of topinambur have been made by water extraction at 65-70°C for one hour. After filtration the filtrate was used for fermentation.

Results and discussion.

For production of citric acid from topinambur it is necessary to isolate new strains of fungi producing acids.

With this purpose fast screening method has been developed to identify the active strains among preliminary Isolated strains. The strains of fungi have been growth on the agar nutrient medium of Czapek with metil rot. During of growth in case of acid production the red zones around colonies are developed. The some strains of fungi belonging to the *Aspergillus* genera and producing citric acid from inulin and single sugar has been isolated. Their physiological and biochemical peculiarities have been studied (the part of this studies will be published later) (Fig. 1). Further studies was carried out with higher active strain *A. niger* N1.

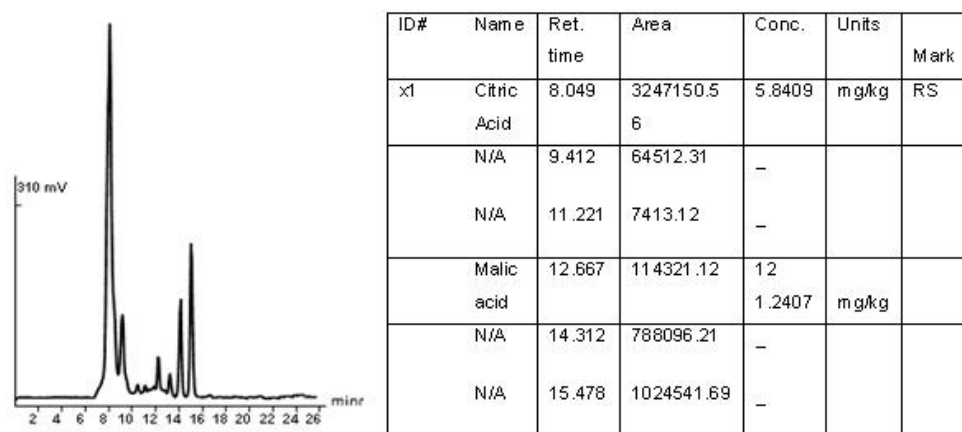


Fig. 1. HPLC analysis of citric acid in extract from topinambur tubers after surface fermentation (t-30° C, pH-6.0) by *A.niger* N1

It was shown that indispensable condition for citric acid biosynthesis from inulin by microorganisms is the presence of their inulinase activity for hydrolysis of inulin to monosaccharide. The isolated and selected strains have inulinase activity. The extra cellular inulinase has been isolated by the worked out method using adsorption and gel chromatography on DEAE-ToyoPerl 65M and Sefadex G75, G100 and its physical and chemical properties (pH, and t-optimums, t and pH-stabilities, substrate specificity, molecular mass, etc.) were studied. The dynamics of extracellular inulinase biosynthesis during cultivation was studied as well. The study of peculiarities of isolated inulinase have shown that the maximum activity observed at pH 5.5 and temperature 45-50° C as well as we investigate the thermal stability and pH-stability which was 60° C and pH 6.5 respectively..

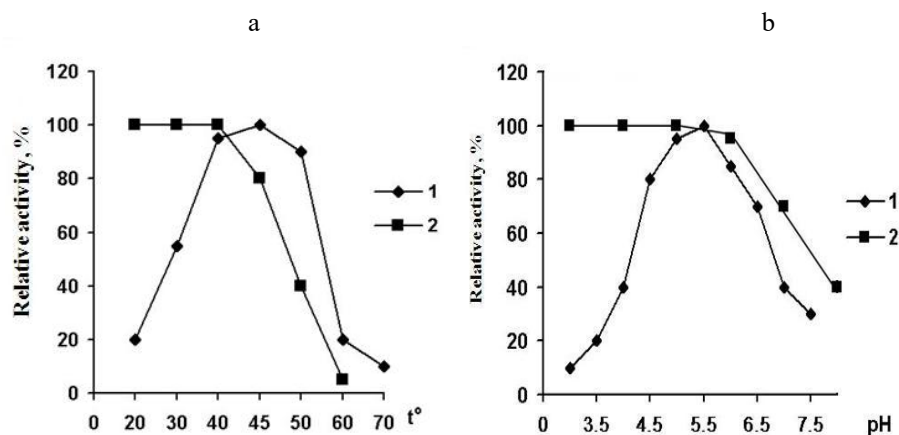


Fig. 2 Influence of temperature and pH on inulinase activity (a) and stability (b)

Study of peculiarity of isolated enzyme have shown that the maximum of activity of extracellular inulinase be observed at 45-50° C and thermostability up to 60 °C. It was shown also that the optimum pH for inulinase activity is pH 5.5, as well as pH-stability in the range of pH 3.5 to 6.5. Correlation between inulinase activity and synthesis of citric acid have been shown. The studies on optimization of the conditions: composition of incubation medium, concentration of substrate, aeration and other factors for bioconversion of inulin. Into citric acid have been carried out. The maximum amount of citric acids observed on 13-15 days of fermentation of 15% solution of inulin. thesis of citric acid from different substrates: sucrose, fructose, inulin, during growth of *A. niger* have been studied. It was shown that the yield of citric acid from fructose and inulin is very close.

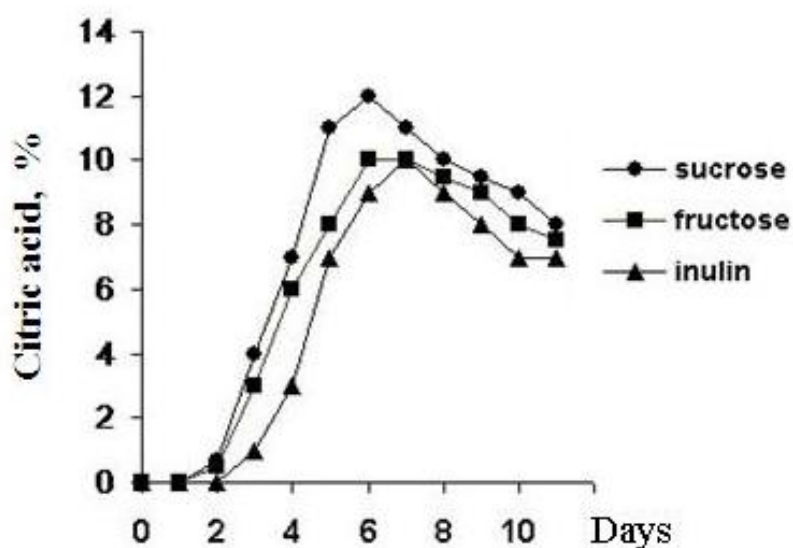


Fig. 3 Synthesis of citric acid from different substrates during the growth of *A. niger-1*

The close results was observed in case of surface and submerged fermentation of extract from tubers of topinambur containing 5% and 15 of inulin. The yield of citric acid from solution with 15% of inulin more than three times.

Summarizing of obtained results we can mentioned the possibility of bioconversion of inulin and simple sugars in tubers of topinambur into citric acid at surface and submerged fermentations by isolated strain of *A.niger NI*. The higher level of yield (70-80%) citric acid from topinambur (inulin and simple sugar) has been shown. It is important to note that the production of citric acid from topinambur is at the same time economically profitable. The yield of produced citric acid from topinambur comparing with sugar beet is much more than twice. The production of citric acid from topinambur is waste less and safe for the environment. The residual after extraction mass of tubers and over ground vegetative mass is highly valuable for forage and raw material for obtaining biogas.

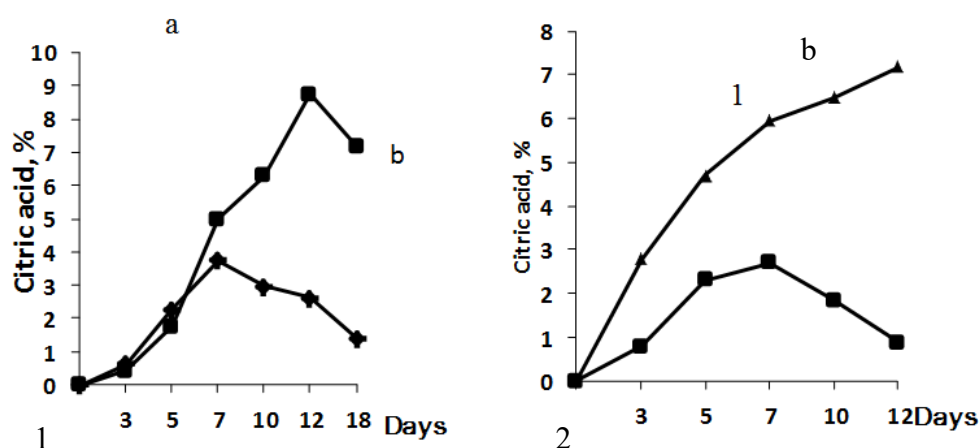


Fig. 4 Synthesis of citric acid from topinambur during surface (1) and submerged (2) fermentation by *A.niger-I* (inulin content 5% (a), 15% (b), at 30°C and aeration 1 L/min.

Thereby for the first time it was established that topinambur is perspective source for microbial production of citric acid.

The researches create the necessary prerequisites for develop one stage biotechnology for production of citric acid from topinambur.

References

1. Kristiansen B., Matthey M. Linden J. Citric Acid Biotechnology, 2002.
2. Yuan X. Identification and Characterization of Starch and Inulin Modifying Network of by Functional Genomics *Aspergillus niger*, 2007.
3. Berovich M., Legia M. Citric acid production, 2007, Biotechnology Annual Review, V13, pp 303-343.
4. Puneekar N, Vaidyanathan C, Rao N. Mechanism of citric acid fermentation by *A. niger*. J Sci. Ind. Res. 1984; 43:p.269-87.
5. Matthey M. The production of organic acids. Crit Rev Biotechnol 1992;12, p.87-132.
6. Wandame E., Derycke D. Microbial inulinase: Fermentation Process, Properties, and Application. Advances in Applied Microbiology. 1983, v.29,p.139-174.
7. Somogyi M. Determination of reducing sugar. Methods in Enzimology, 1966, 8, p.3-26.
8. Chi Z., Liu J., Zhang W. Trehalose accumulation from soluble starch by *Saccharomycopsis fibuligera sdu*. Enzyme and Microbial Technology. 2001; 28(2-3), p.240-246.
9. Auerbach C. Citric acid production by *Aspergillus niger*, estimation of citric acid // Technical Resources in Biotechnology, 2012 (39), N7.

NEW APPROACHES TO ENHANCE HYDROGEN PRODUCTION FROM GLYCEROL BY *ESCHERICHIA COLI*

A. POLADYAN

Yerevan State University, Department of Biochemistry, Microbiology and Biotechnology,
Research Institute of
apoladyan@ysu.am

Glycerol as a waste material of biodiesel and other industries can be considered for biological hydrogen (H_2) production. Upon *Escherichia coli* glycerol fermentation formate, ethanol and etc. are produced. Formate decomposition by formatehydrogenase enzymes lead to H_2 and CO_2 formation. Four [NiFe] Hydrogenase (Hyd) enzymes are involved in this process for activity of which heavy metals can be required. The results obtained identify the conditions when reductive conditions has essential role for H_2 production in *E. coli* upon glycerol fermentation. Moreover, mixed carbons or addition of some heavy metal ions enhance H_2 generation. These approaches might be applied to regulate H_2 metabolism upon bacterial industrial wastes (glycerol) fermentation resulting enhanced H_2 production.

Escherichia coli; H_2 production, oxidation-reduction potential; hydrogenase enzymes; glycerol/formate fermentation

Գլիցերոլը որպես կենսադիզելի և այլ արտադրությունների թափոն կարող է հաջողությամբ կիրառվել կենսաջրածնի (H_2) ստացման համար: *Escherichia coli*-ին գլիցերոլի խմորման ժամանակ արտադրում է մրջնաթթու, էթանոլ և այլ վերջնական արտադրանքներ: Մրջնաթթու ջրածնիկազ ֆերմենտը մրջնաթթուն վերածում է միևնույն H_2 -ի և CO_2 -ի: Չորս [NiFe] հիդրոգենազ (Հիդ) ֆերմենտներ, որոնց ակտիվության համար մետաղներ են անհրաժեշտ, մասնակցում են այդ գործընթացին: Ստացված տվյալները վկայում են, որ վերականգնված ռեդոքս պոտենցիալով միջավայրը էական է գլիցերոլի խմորման ընթացքում *E. coli*-ի H_2 արտադրության համար: Խառը ածխածնի աղբյուրները և որոշ ծանր մետաղներ խթանում են H_2 -ի արտադրությունը: Այս մոտեցումները կարող են կիրառվել H_2 -ի կյուլթափոխականության կարգավորման նպատակով և կապաստեն արդյունաբերական թափոններից (գլիցերոլից) կենսաջրածնի ստացման խթանմանը:

Escherichia coli, H_2 արտադրություն, օսիդատիվ-վերականգնող ակտիվություն, հիդրոգենազ ֆերմենտներ, գլիցերոլ/մրջնաթթու խմորում

Глицерол – отход биодизельного и других производств может быть успешно использован для получения биоводорода (H_2). В процессе брожения глицерола *Escherichia coli* выделяет муравьиную кислоту, этанол и другие конечные продукты. Фермент формат водород лиаза трансформирует муравьиную кислоту до H_2 и CO_2 . Четыре [NiFe] гидрогеназы, для активации которых необходимы ионы металлов, участвуют в этом процессе. Полученные результаты свидетельствуют о том, что среда с восстановленным редокс потенциалом существенна при брожении *E. coli* для производства H_2 . Данные подходы могут быть применены для регулирования метаболизма H_2 у бактерий *E. coli*, содействуя промышленному получению биоводорода из отходов (глицерола).

Escherichia coli, производство H_2 , окислительно-восстановительный потенциал, ферменты гидрогеназы, брожение глицерол/муравьиной кислоты

Molecular Hydrogen (H_2) is being recognized as an energy alternative for the future. It is clean, renewable with high energy content, as the energy dismissed upon its combustion ($\sim 142 \text{ kJ g}^{-1}$) is ~ 3.5 fold greater than oil [1, 9, 10]. Dark fermentation is considered as one of the most favored technologies for H_2 production with a great potential for commercialization in the near future. In this respect, genetically and metabolically easy manipulating bacterium *Escherichia coli*, performing dark fermentation and leading to H_2

formation is good candidate to refer for biotechnological proposes [9, 10]. Moreover, the use of cheap substrates (agricultural and food industry wastes) rich of nutrients can be used for H₂ production. This will lead to low-priced H₂ generation with immediate waste treatment [2, 7]. In this regard, glycerol which is commonly recognized as an industrial significant waste, can be used as carbon source by bacteria for H₂ and other valuable chemical compounds production [2, 9].

H₂ is produced from formate, the end product of glycerol or sugar (glucose) fermentation of *E. coli*, by formate dehydrogenase H (FDH-H) and hydrogenase (Hyd) enzymes [4, 8, 10]. In *E. coli* possesses four [Ni-Fe]-Hyd enzymes encoded by *hya*, *hyb*, *hyc*, *hyf* operons, respectively. For functioning of Hyds and FDH-H heavy metals Ni and Fe and Mo, respectively, are involved and make available pathways for proton and electron transfer during H₂ formation or oxidation [4, 5, 8]. The operation direction (H₂ formation or oxidation) of Hyd enzymes is depends on many factors, such as carbon (glycerol or glucose) source, pH of the growth medium, etc.: it was stated that Hyd-1 and Hyd-2 function in H₂ oxidation upon glucose and H₂ production modes upon glycerol fermentation [4, 9, 10]. The optimal activity of Hyd-1 was detected under anaerobic conditions, at acidic pH and in the presence of formate, whereas Hyd-2 was at more reduced environment and alkaline pH [4,9,10].

Direct effect of metals on Hyd enzyme activity was also proposed, as the addition of Fe²⁺ affected H₂ production rate by *E. coli in vivo* and increased it *in vitro* at pH 6.5 and pH 7.5 during glycerol fermentation [11]. On the other hand, formate is considered a rich-energy compound as the oxidation and reduction potential of the formate: H₂ couple is very reduced (-420 mV) [12, 13], can be additional energy source during energy restricted (fermentative) conditions [5]. *E. coli* produces and initially secretes formate out of the cells to prevent acidification of the cytoplasm. When the drop of bacterial growth pH is accrued, formate is re-imported into the cell through formate channel FocA and metabolized [5]. Pyruvate formate lyase directly interacts with the FocA and regulates formate translocation. It was proposed that the *hyc* operon is regulated solely in response to formate concentration at low pH. Moreover, formate in flux may result the destruction of Δp, therefore the control of formate metabolism is very important [5,10,12].

The metabolism of bacteria is known to be a set of redox processes affecting ORP. ORP drop (down to -550-600 mV) during anaerobic growth of bacteria in the absence of external electron acceptors has been well-established [12, 13]. ORP is proposed to be valuable for monitoring changes in the metabolic state of bacterial cultures in biotechnology and for optimizing yield of fermentation yields, and has been shown can be useful to discriminate between bacterial species [13].

Thus, many factors such as different ORP, mixed carbon (formate and glycerol) and heavy metal ions (involved in redox reactions of FHL system) influence on bacterial growth and particularly H₂ metabolism are investigated and discussed in the present work.

Determination of *E. coli* batch culture oxidation reduction potential and H₂. H₂ production by bacteria is determined by various qualitative and quantitative methods [12, 13]. It might be determined by chemical reaction of color disappearance during interaction of potassium permanganate (KMnO₄) solution in sulfur acid (H₂SO₄) with H₂ [18]. Chemical detection and gas chromatography of H₂ require gas extraction and calculation of its solubility in an aqueous medium. The use of a couple of oxidation-reduction (for example, platinum (Pt) and titanium-silicate (Ti-Si)) electrodes measuring ORP has certain advantages. In contrast to Pt, Ti-Si electrode readings are not affected by the presence of H₂ (or oxygen) in the medium; this allows differentiation of H₂ in the growth and assay medium under anaerobic conditions [12,13]. Transformation of ORP data into quantity (concentration) of H₂ expressed in mol/L [13].

Oxidative and reductive routes of glycerol fermentation by *Escherichia coli* batch cultures and their regulation by oxidizing and reducing reagents. ORP critical role in *E. coli* growth in anaerobic conditions [12,13] means that various oxidizers and reducers affecting ORP can mediate growth of bacteria. ORP kinetics and H₂ production was measured in bacterial batch cultures by the difference of pair of redox Pt and Ti-Si electrodes readings [6]. An impermeable oxidizer K₃[Fe(CN)₆] (1 mM) and reducers DTT (3 mM) and dithionite (1 mM) were implemented for application of ORP initial positive (+235±10 mV) and negative (-250±10 mV) values to bacteria, respectively. In the presence of K₃[Fe(CN)₆] *E. coli* growth at different pHs was inhibited resulting in decrease of ORP only to 130±5mV at the log growth phase[6]. In this condition ORP positive or less negative may oxidize thiol groups on bacterial surface and affect on membrane transport and enzymes like F₀F₁ or TrkA under anaerobic conditions, leading to low activity of key enzymes in bacterial fermentation metabolism [10].

Table 1. The effects of reducers on H₂ yield by *E. coli* BW25133 during growth under glycerol fermentation at different.

Growth medium pH	H ₂ yield, mol/L		
	Control	Reducers	
		DTT ^c	Dithionite ^b
5.5	0.10±0.01 ^a	0.80±0.04 ^c	ND ^d
6.5	0.73±0.02 ^a	1.30±0.04 ^c	ND
7.5	0.70±0.03 ^a	1.40±0.05 ^c	2.00±0.05 ^c

^abacterial culture was of ~8 h growth; ^b3 mM DTT, 1 mM dithionite were added into the growth medium; ^cbacterial culture was of ~3-4 h growth; ^d ND: not determined.

In order to carry out the metabolic processes efficiently, it is very important to maintain the intracellular environment in the reducing state. However, membrane-permeating reducing reagents DTT and dithionite, reducing ORP to negative values (-280±12 mV), inhibited the growth of *E. coli* during glycerol fermentation in a concentration-dependent manner [6]. Obviously, extreme reducing conditions may lead to instability in the metabolism. Besides, it was stated, that upon glycerol fermentation DTT at different pHs and dithionite but not oxidizer at pH 7.5 stimulated ~2-3 fold H₂ production in the log growth phase (Table 1). Similar effect with DTT was observed previously during glucose fermentation in *E. coli* [13]. Probably, the reduced environment might lead to formate concentration increase which then can be source for H₂ and CO₂ [6]. It should be noted that because of instability of this reagent in acidic environment effect of dithionite on bacteria was investigated only at pH 7.5.

***Escherichia coli* hydrogen production in batch culture upon formate alone and with glycerol co-fermentation.** To understand the effect of formate on growth in batch culture, H₂ production at different pHs (5.5-7.5) during glycerol fermentation in *E. coli* and $\Delta hyaB$, $\Delta hybC$, $\Delta hycE$, $\Delta hyfG$ hydrogenase mutants with deletions of different key subunits of Hyd-1 to 4, respectively, were investigated and main experiments are illustrated in Fig. 1 [12]. 10 mM formate ~2 fold and 30 or 50 mM formate, completely inhibited wild type growth during glycerol fermentation at pH 5.5, whereas at pH 7.5 and 6.5 formate in the

same concentrations stimulated or had no effect on bacterial growth [12]. So in other experiments when needed 10 mM formate was supplemented to the growth medium.

From the beginning of the lag growth phase the drop of Pt and Ti-Si electrodes from positive to negative values was detected in wild type upon glycerol or formate alone or their combined conditions, pH 6.5 (Fig. 1,a). H₂ formation was observed in wild type with the yield of 0.75 ± 0.03 mmol/L at the end of log growth phase, formate supplementation led to 0.83 ± 0.05 mmol/L H₂ generation at early log phase, which was stimulated ~1.1 fold upon formate and glycerol co-supplementation at pH 6.5 (Fig. 1,a). The same stimulating effect by formate or in combination with glycerol was observed at pH 7.5 [12]. Increased, 1.45 to 2.2 ± 0.05 mmol/L H₂ production was detected during growth of *hyaB* mutant upon all substrates combinations utilization at pH 6.5 and formate alone at pH 7.5, except upon glycerol only fermentation at pH 7.5 at the beginning of log growth phase. Note, H₂ was not produced in *hycE* (with defective Hyd 3) mutant. H₂ was also produced in *hybC* (with defective Hyd2) mutant during glycerol fermentation at pH 6.5 with the yield of 0.8 ± 0.05 mmol/L, and again stimulated ~1.2 fold to ~1.3 fold during formate alone or with glycerol combination (Fig 1,b). Thus, in the cells grown both with external formate and glycerol H₂ production was stimulated [12]. This stimulation was not pH dependent. The effect can be contributed to Hyd 3 increased activity upon bacterial glycerol fermentation.

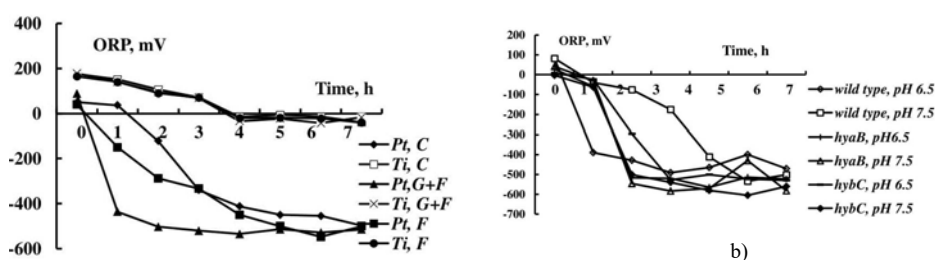


Fig. 1. The kinetics of ORP by *E. coli* BW25113 and Hyd mutants during co-fermentation of 10 g/l glycerol (G) and 10 mM formate (F). a) Only *E. coli* BW25113 ORP kinetics are presented, pH 6.5; control (C) was ORP kinetics in the medium with 10 g/l glycerol; b) The ORP kinetics by *E. coli* wild type and Hyd mutants at pH 6.5 and pH 7.5.

Enhancements of *Escherichia coli* hydrogen production by heavy metal ions and their mixtures during glycerol fermentation. In the study [11] *E. coli* growth was followed during 10 g/L glycerol batch culture fermentation at pH 5.5 to pH 7.5 in the presence of various heavy metal ions with different oxidation states, as Ni²⁺, Fe²⁺ or Fe³⁺, Mo⁶⁺ and their mixtures at various concentrations. It is worth to mention that the metal ions concentrations were used relying on the results for *E. coli* and other bacteria [4, 5, 11]. H₂ production yield was 0.75 ± 0.02 mmol H₂/L at 12 h growth of *E. coli* at pH 6.5 during glycerol fermentation, and it was noticeably stimulated (1.9 to 3 fold) in the presence of mixtures of Ni²⁺+Fe³⁺, Ni²⁺+Fe³⁺+Mo⁶⁺ or Fe³⁺+Mo⁶⁺ (see Table 2).

Table 2. H₂ production yield of *E. coli* BW25113 during glycerol fermentation in the presence of heavy metal ions.

Growth conditions ^a	pH 5.5	pH 6.5	pH 7.5	
	H ₂ yield, mmol H ₂ L ⁻¹	H ₂ yield, mmol H ₂ L ⁻¹	H ₂ yield, mmol H ₂ L ⁻¹ (log growth phase)	H ₂ yield, mmol H ₂ L ⁻¹ (station growth phase)
Control^c	0.50±0.02	0.75±0.02	0.75±0.02	0.81±0.02
Ni²⁺	0.75±0.03 (p<0.01) ^d	0.71±0.03 (p>0.05)	0.77±0.03 (p>0.05)	1.35±0.01 (p<0.001)
Fe²⁺	0.60±0.02 (p<0.05)	0.70±0.02 (p>0.05)	0.75±0.02 (p>0.05)	0.83±0.02 (p>0.05)
Fe³⁺	0.46±0.04 (p>0.05)	0.71±0.04 (p>0.05)	0.72±0.04 (p>0.05)	1.33±0.04 (p>0.001)
Mo⁶⁺	0.60±0.03 (p<0.05)	0.75±0.03 (p>0.05)	0.64±0.03 (p>0.05)	0.81±0.03 (p>0.05)
Ni²⁺+Fe³⁺	0.70±0.01 (p<0.01)	1.30±0.01 (p<0.001)	0.81±0.01 (p<0.05)	1.35±0.01 (p<0.001)
Ni²⁺+Fe²⁺	0.64±0.02 (p<0.025)	0.80±0.02 (p>0.05)	0.80±0.02 (p<0.05)	1.36±0.02 (p<0.001)
Fe³⁺+Mo⁶⁺	0.60±0.01 (p<0.05)	2.20±0.01 (p<0.001)	0.75±0.01 (p>0.05)	1.35±0.01 (p<0.001)
Fe²⁺+Mo⁶⁺	0.57±0.03 (p<0.05)	1.40±0.03 (p<0.01)	0.77±0.03 (p>0.05)	1.38±0.03 (p<0.001)
Ni²⁺+Fe³⁺+Mo⁶⁺	0.77±0.01 (p<0.002)	1.50±0.01 (p<0.01)	0.81±0.01 (p<0.05)	2.24±0.01 (p<0.001)
Ni²⁺+Fe²⁺+Mo⁶⁺	0.68±0.01 (p<0.01)	0.8±0.01 (p>0.05)	0.83±0.01 (p<0.05)	1.50±0.01 (p<0.001)

^a 10 g/L glycerol was added into the growth medium; 50 µM Ni²⁺, Fe²⁺ or Fe³⁺, 20 µM Mo⁶⁺, were supplemented into the growth medium when mentioned; ^b oxidation-reduction potential measured by Pt electrode; ^c control was without metal supplementation; ^d p for difference between the experiment and appropriate control

Similar data were obtained at the certain conditions but at pH 5.5: though the H₂ production yield was ~1.5 fold decreased (0.50±0.02mmol H₂/L) compared with pH 6.5, but metal ions addition again stimulated H₂ yield, particularly ~1.5 fold upon addition of Ni²⁺ alone and Ni²⁺+Fe³⁺, Ni²⁺+Fe³⁺+ Mo⁶⁺ or Ni²⁺+Fe²⁺+ Mo⁶⁺ (see Table 2).

Interesting data with *E. coli* was observed during glycerol fermentation at pH 7.5. Effects of metal ions on H₂ production yield were intense at station growth phase: H₂ production yield was ~1.7 fold stimulated upon all metals (Ni²⁺, Fe³⁺, Fe²⁺ and Mo⁶⁺) and 2.7-3 fold upon Ni²⁺+Fe³⁺+Mo⁶⁺ mixture supplementations (see Table 2). Some metals have a role in Hyd enzymes biosynthesis and maturation processes, or they might affect enzymes activity [4,5,11].

Concluding remarks. Thus, ORP might one of the physicochemical parameters to take into account for optimizing fermentation processes and developing H₂ production biotechnology. Oxidizers and reducers were used for application of positive and negative ORP values, respectively. Although bacterial growth was repressed upon oxidative and reductive stresses both, the reductive conditions only stimulated H₂ generation upon glycerol fermentation. Externally supplied formate regulates H₂ production and cell growth in *E. coli* growing on glycerol. Moreover, mixed carbon (co-supplementation of formate with glycerol) might have industrial advantageous application to enhance bio-hydrogen production. Note, responsible Hyd enzymes are relieved upon mixed carbon utilization. In addition, some heavy metals (nickel (Ni²⁺) and iron (Fe³⁺, Fe²⁺), molybdenum (Mo⁶⁺))

having a role as structural components of Hyd and FDH-H enzymes stimulate bacterial growth and H₂ production upon glycerol utilization.

Consequently, glycerol co-fermentation with organic acids, effects of reducing reagents, heavy metals ions and effective strains could be considered as novel approaches to enhance H₂ in production (Fig. 2). The coupling of H₂ production to utilization of waste materials containing high concentrations of glycerol may same time provide economic and environmental benefits. The results might be taken into account for optimizing fermentation processes on glycerol and developing H₂ production biotechnology.

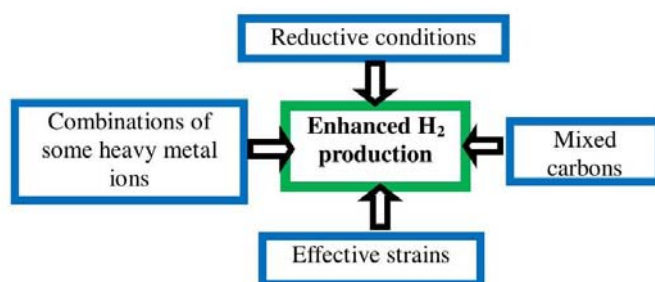


Fig. 2. Approaches to enhance H₂ production by *E. coli* BW25113 during glycerol fermentation.

Acknowledgements

The author thanks to Prof. A. Trchounian (Yerevan State University, Armenia) for voluble comments and discussions. This work was supported by Research grants of State Committee of Science, the Ministry of Education and Science of Armenia, to AT (#13-F002 and 15T-1F123), USA based Armenian National Science and Education Fund grant to AP (NS-biotech-4376 and NS-Microb-3212).

References

1. Chu S., Majumdar A. Opportunities and challenges for a sustainable energy future. *Nature*, 488, 294-303, 2012.
2. Clomburg J.M., Gonzalez R. Anaerobic fermentation of glycerol: a platform for renewable fuels and chemicals. *Trends Biotechnol.*, 31, 20-28, 2013.
3. Hakobyan L., Gabrielyan L., Trchounian A. Ni (II) and Mg (II) ions as factors enhancing biohydrogen production by *Rhodospirillum rubrum* from mineral springs, *Int. J. Hydrogen Energy*, 37, 7486-7491, 2012.
4. Pinske C., Sawers R.G. Anaerobic formate and hydrogen metabolism. *EcoSalPlus*. DOI: 10.1128/ecosalplus.ESP-0011-2016.
5. Pinske C. and Sawers G. The importance of iron in the biosynthesis and assembly of [NiFe]-hydrogenases. *Biomolecular concepts*, 5, 55-70, 2014.
6. Poladyan A., Avagyan A., Vassilian A., Trchounian A. Oxidative and reductive routes of glycerol and glucose Fermentation by *Escherichia coli* batch cultures and their regulation by oxidizing and reducing reagents at different pHs. *Curr. Microbiol.*, 66, 49-55, 2013.
7. Sargsyan H., Gabrielyan L., Trchounian A. Novel approach of ethanol waste utilization: biohydrogen production by mixed cultures of dark- and photo-fermentative bacteria using distillers grains. *Int. J. Hydrogen Energy*, 41, 2377-82, 2016.
8. Sargent F. The model [NiFe]-hydrogenases of *E. coli*. *Adv. Microb. Physiol.*, 68, 433-507, 2016.
9. Trchounian K., Trchounian A. Hydrogen production from glycerol by *Escherichia coli* and other bacteria: An overview and perspectives. *Appl. Energy*, 156, 174-84, 2015.
10. Trchounian K., Poladyan A., Vassilian A., Trchounian A. Multiple and reversible hydrogenases for hydrogen production by *Escherichia coli*: Dependence on fermentation substrate, pH and the F₀F₁-ATPase. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 47, 236-249, 2012.

11. Trchounian K., Poladyan A., Trchounian A. Enhancement of *Escherichia coli* bacterial biomass and hydrogen production by some heavy metal ions and their mixtures during glycerol vs glucose fermentation at a relatively wide range of pH. International Journal of Hydrogen Energy, 42(10), 6590-6597, 2017.
12. Trchounian K., Abrahamyan V., Poladyan A. Armen Trchounian. *Escherichia coli* growth and hydrogen production in batch culture upon formate alone and with glycerol co-fermentation at different pHs. International journal of hydrogen energy, 40, 9935-9941, 2015.
13. Vassilian A., Trchounian A. Environment oxidation-reduction potential and redox sensing by bacteria. in: Trchounian A (Ed) Bacterial Membranes. Ultrastructure, Bioelectrochemistry, Bioenergetics and Biophysics Research Signpost, Trivandrum, Kerala (India) 163-195, 2009.

Biol. Journal of Armenia, 1 (69), 2017

THE STUDY OF CALCINEURIN ACTIVITY IN PATHOPHYSIOLOGY OF OVARIAN CANCER

**F. P. SARUKHANYAN, G. A. HOVHANNISYAN, O. V. HUNANYAN,
H. H. ZAKARYAN, N. H. BARKHUDARYAN**

*H. Buniatian Institute of Biochemistry NAS RA, Yerevan, Armenia
floras@biochem.sci.am*

In present study the changes of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin activity in pathophysiology of ovarian cancer has been investigated. Calcineurin activity has been determined by the spectrofluorimetrically in plasma and tissue samples of the oncologic patients with different stages of disease. Results obtained suggested that, depending on the stage (I, II, III) of disease, calcineurin activity was shown to be increased in the plasma and tumor tissue of ovarian cancer patients. It is necessary to emphasize that changes in calcineurin activity in the pathophysiology of ovarian cancer also depend on tissue differentiation.

Calcineurin - ovarian cancer – inflammation - tissue differentiation

Ներկա աշխատանքում ուսումնասիրվել է Ca^{2+} /կալմոդուլին-կախյալ պրոտեին ֆոսֆատազ կալցինեյրինի ակտիվության փոփոխությունը ձվարանների բաղկացրած պաթոֆիզիոլոգիայում: Կալցինեյրինի ակտիվությունը որոշվել է հիվանդության տարբեր փուլերում գտնվող բաղկացրած հիվանդների պլազմայի և հյուսվածքային նմուշներում սպեկտրաֆլուորիմետրիկ եղանակով: Ստացված տվյալները վկայում են, որ, հիվանդության փուլից (I, II, III) կախված, կալցինեյրինի ակտիվությունն աճում է ձվարանների բաղկացրած հիվանդների պլազմայում և ուռուցքային հյուսվածքում: Հարկ է ընդգծել, որ կալցինեյրինի ակտիվության փոփոխությունը ձվարանների բաղկացրած պաթոֆիզիոլոգիայում կախված է նաև հյուսվածքային դիֆերենցիացիայից:

Կալցինեյրին – ձվարանների բաղկացրած բորբոքում – հյուսվածքային դիֆերենցիացիա

В настоящей работе было изучено изменение активности Ca^{2+} /кальмодулин-зависимой протеин фосфатазы кальцинейрина при патофизиологии рака яичников. Активность кальцинейрина была определена спектрофлуориметрически в образцах плазмы и ткани онкологических больных с различными стадиями заболевания. Полученные данные показали, что активность кальцинейрина в зависимости от стадии (I, II, III) заболевания увеличивается в плазме и опухолевой ткани больных с раком яичников. Необходимо подчеркнуть, что изменения активности кальцинейрина при патофизиологии рака яичников также зависят от дифференциации тканей.

Кальцинейрин – рак яичников – воспаление – дифференциация тканей

Currently the most promising area of biomedical studies is detection of endogenous molecules and signaling pathways that may serve as a target for the new anticancer drugs without side effects, unlike radiation and chemotherapy. Among the targets of modern anticancer drugs are mitogenic-activated protein kinase (MAPK), MAPK kinase (MEK), protein kinase C (PKC), vascular endothelial growth factor (VEGF), antiapoptotic protein Bcl-2 and other molecules [5]. It should be emphasized that Ca^{2+} /calmodulin (CaM)-dependent protein phosphatase calcineurin (CN or PP2B) is a partner of PKC, MAPK, MEK, VEGF, Bcl-2 and other protein targets for anticancer drugs [3, 6-7, 9, 12-13]. Recently, we have detected and identified the following proteins as CN-multiprotein complexes: S100-A9 protein, Histon H4, Copine-1 and -3, etc. [2]. It is already established that these protein partners of CN are involved in pathophysiology of cancer.

CN is a key enzyme leading to activation of the immune system by participating in the synthesis of several cytokines (interleukin (IL)-2, IL-4, IL-5, tumor necrosis factor (TNF) α , interferon (INF) γ , etc.) via dephosphorylation and activation of NFAT (nuclear factors of activated T cells) transcription factors [7, 9, 12]. It should be noted that the Ca^{2+} /CaM/CN/NFAT signaling pathways are involved in pathophysiology of cancer as well [9-10]. It is necessary to underscore that CN demonstrates bifunctional activity depending on different physiological and pathophysiological conditions of the organism. Its activity was reported to be decreased in pathophysiology of cervical cancer [11] and sarcoma-45 [1]. In contrary, CN activity was found to be increased in lymphoblastic leukemia [10]. Thus, CN demonstrates different activity in pathophysiology of cancer. We hypothesized that the opposite effects of CN in pathophysiology of cancer may depend on tumor-bearing organ, stage of disease and other reasons. Therefore, the study of changes in CN activity in plasma and tissue samples of untreated patients with primary ovarian cancer was the main goal of present work.

Material and methods. Sample collection and preparation. The blood and tissue samples from postoperative material of untreated patients (n=15) with the I, II and III stages of primary ovarian cancer were provided by the National Centre of Oncology after V.A. Fanarjyan (NCO MOH RA). The plasma of healthy donors (n=5) and histologically checked healthy parts of remote tissue were used as a control. Histological study of the postoperative material was conducted by the Laboratory of Clinical Pathomorphology at the NCO MOH RA. The most cases of ovarian cancer were diagnosed as a moderately and poorly differentiated adenocarcinoma. Age of patients ranged from 45-80, and the average age was 61 years.

Blood was collected into sodium citrate (3.2%)-coated vacutainer tubes and centrifugated at 1500 rpm for 10 min. Plasma was separated into aliquots and stored at -70°C . Tissue samples were homogenized with 5 volumes of 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 buffer, containing 0.05% Triton-X-100, 0.1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol (DTT), protease inhibitors, and centrifugated at $100\,000\times g$ for 60 min at 4°C . The supernatant was separated and stored at -70°C as well. Protein content in samples was determined by Bradford assay [4].

Calcineurin activity. CN activity was measured spectrofluorimetrically using 4-methylumbelliferyl phosphate (4-MUP) as a substrate. A typical enzyme assay was performed in 1 ml of incubation mixture, containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.5 mM DTT, 1 mg/ml bovine serum albumin, 1 mM MgCl_2 , 0.3 mM CaCl_2 , 1 μM 4-MUP, and necessary amount of enzyme ($100\,000\times g$ tissue homogenate or plasma). One unit of enzyme activity is defined as amount of enzyme that caused the formation of 0.1 nM of 4-methylumbelliferon (4-MU) at 32°C for 1 h. After incubation the reaction was stopped by addition of 0.25 ml of 30% trichloroacetic acid. After centrifugation at $5000\times g$, the pH of supernatant was adjusted to 8.0 by addition of 0.5 ml of 1 M Tris. The quantity of 4-MU

was determined fluorimetrically using Perkin-Elmer MPF-44A spectrofluorimeter. The fluorescence was measured at 445 nm (Excitation at 365 nm). As control the substrate and enzyme were incubated separately.

Statistical analysis. Data were analyzed statistically by one-way ANOVA using Origin 61 software. Statistical significance – $p < 0.05$. All data were expressed as mean $\pm$ SEM.

Results and Discussion. Results obtained have been demonstrated that in plasma of ovarian cancer patients CN activity was shown to be increased in the I, II and III stages of disease by 6.6, 10 and 11 times, respectively, compared with control (Fig. 1a). A similar picture was observed in tumor tissue of these patients. As shown in Fig. 1b, CN activity was shown to be increased in the I, II and III stages of disease by 3.3, 4.8 and 5.8 times, respectively, compared with control.

The changes of CN activity depending on histological differentiation were studied as well. Among the patients studied, there were no women diagnosed with well differentiated adenocarcinoma. We have found that CN activity in plasma of patients with moderately and poorly differentiated adenocarcinoma has been increased by 7.5 and 11.5 times, respectively, compared with control (Fig. 2a). Similarly, CN activity in tumor tissue samples of patients with moderately and poorly differentiated adenocarcinoma was higher by 3.2 and 5.5 times, respectively, compared with control (Fig. 2b). Thus, in case of poorly differentiated ovarian adenocarcinoma CN activity is significantly higher than in moderately differentiated adenocarcinoma. These data are consistent with the abovementioned results since the advanced stages of cancer are characterized mainly by poorly differentiated cells.

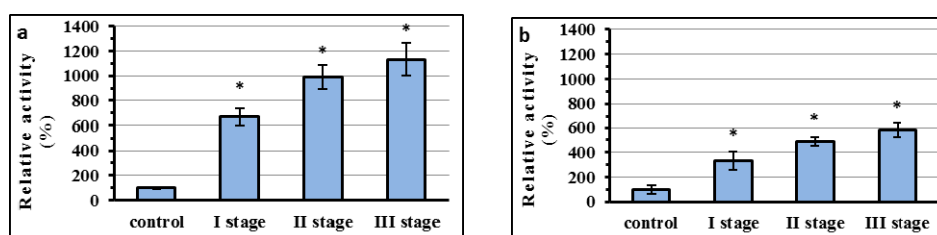


Fig. 1. CN activity in plasma (a) and tumor tissue (b) of primary ovarian cancer patients. *- $p < 0.05$ for the I stage ($n=5$) compared with control ($n=5$), and for II ($n=5$), III ($n=5$) stages compared with the I stage.

The significant increase in CN activity in all stages of ovarian cancer indicates on similar increase in the level of proinflammatory cytokines (IL-1, IL-6, IL-2, $\text{TNF}\alpha$), because, CN participates in the synthesis of these cytokines via activation of NFAT [7, 9, 12]. Indeed, the increase in the level of some proinflammatory cytokines, depending on the stage of ovarian cancer, has been demonstrated by the other studies [8]. Abovementioned cytokines could be synthesized by tumor cells, as well as by the immune system cells (macrophages, T-lymphocytes, etc.) since the organism uses the inflammatory response to fight against the neoplasms. However, such a chronic activation of the immune system contributes to chronic inflammation, which in turn stimulates tumor progression. Currently, ovarian cancer is shown to be associated with inflammatory processes [8]. Therefore, down-regulation of CN activity may be beneficial for ovarian cancer patients.

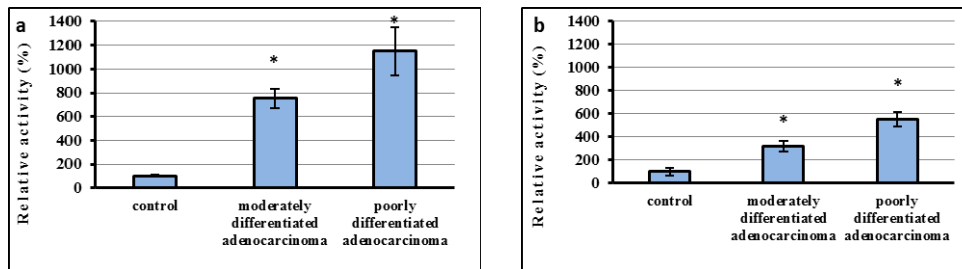


Fig. 2. CN activity in plasma (a) and tumor tissue (b) of primary ovarian cancer patients depending on tissue differentiation. * $p < 0,05$ for the moderately differentiated adenocarcinoma ($n=5$) compared with control ($n=5$), and for poorly differentiated adenocarcinoma ($n=5$) compared with moderately differentiated adenocarcinoma.

Thus, in present work we have shown for the first time the involvement of CN in pathophysiology of ovarian cancer, as well as demonstrated that changes in CN activity in plasma and tumor tissue of patients with primary ovarian cancer depend on stage of disease and degree of tissue differentiation. Data obtained in this study can be used to develop new anticancer drugs for which the $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}/\text{CN}/\text{NFAT}$ signaling pathways can be a target.

Acknowledgment. We thank to NCO after V. A. Fanarjyan (MOH RA), particularly the Laboratory of Clinical Pathomorphology, for provided oncological samples.

References

1. Barkhudaryan NH, Hunanyan OV, Sarukhanyan FP, Stepanyan HM, Zakaryan HH, Grigoryan IE, Dalyan EB. Molecular mechanisms of anti-tumor effect of hemorphin-7 in vivo. *Medical Science of Armenia*, L11 (1): 21-32, 2012.
2. Barkhudaryan NH, Sarukhanyan FP, Gabrielyan AV, Hunanyan OV, Berberich-Siebert F, Kellermann J, Serfling E. Isolation and Identification of calcineurin-multiprotein complexes by tandem affinity purification method. *Materials of the conf. "Physiological mechanisms of organisms' functional regulation"*, Yerevan, p. 96-100, 2012.
3. Bekay REI, Alvarez M, Monteseirin J, Alba G, Chacon P, Vega A, Martin-Nieto J, Jimenez J, Pintado E, Bedoya FJ, Sobrino F. Oxidative stress is a critical mediator of the angiotensin II signal in human neutrophils: involvement of mitogen-activated protein kinase, calcineurin, and the transcription factor NF- κ B. *Blood*, 102: 662- 671, 2002.
4. Bradford MM. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248-254, 1976.
5. Buolamwini JK. Novel anticancer drug discovery. *Current Opinion Chem Biol*, 3:500-509, 1999.
6. Dumont FJ, Staruch MJ, Fischer P, DaSilva C, Camacho R. Inhibition of T cell activation by pharmacologic disruption of the MEK1/ERK MAP kinase or calcineurin signaling pathways results in differential modulation of cytokine production. *J Immunol*, 160: 2579-2589, 1998.
7. Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin and NFAT. *Genes Dev*, 17: 2205-2232, 2003.
8. Macciò A, Madeddu C. Inflammation and Ovarian Cancer. *Cytokine*, 58(2): 133-47, 2012.
9. Manchini M, Toker A. NFAT proteins: Emerging role in cancer progression. *Nat Rev Cancer*, 9: 810-820, 2009.
10. Medyouf H, Alcalde H, Berthier C, Guillemin MC, dos Santos NR, Janin A, Decaudin D, de Thé H, Ghysdael J. Targeting calcineurin activation as a therapeutic strategy for T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nature Medicine*, 13: 736-741, 2007.
11. Padma S, Sowjanya AP, Poli UR, Jain M, Rao BN, Ramakrishna G. Downregulation of calcineurin activity in cervical carcinoma. *Cancer Cell Int*, 5: 7-12, 2005.
12. Serfling E, Berberich-Siebert F, Chuypilo S, Jankevics E, Klein-Hessling S, Twardzik T, Avots A. The role of NF-AT transcription factors in T cell activation and differentiation.

-
- Biochem Biophys Acta, 1498: 1–18, 2000.
13. Shirane M, Nakayama KI. Inherent calcineurin inhibitor FKBP38 targets Bcl-2 to mitochondria and inhibits apoptosis. Nat Cell Biol, 5: 28-37, 2003.

Biolog. Journal of Armenia, 1 (69), 2017

CRUPINA VULGARIS CASS. IN VITRO CULTURE OBTAINING

SEMERJYAN I., PETROSYAN M., SAHAKYAN N., TRCHOUNIAN A.

*Yerevan State University, Department of Biochemistry, Microbiology and Biotechnology,
isemerjyan@ysu.am*

The *in vitro* cultivation conditions for obtaining the isolated culture of *Crupina vulgaris* were firstly developed. Callus culture was obtained on MS (Murashige and Skoog) basal medium, supplemented with 2.0 mg/L indole 3 acetic acid (IAA), 0.2 mg/L kinetin, but further growth was supported on both MS medium and its modification, containing 6-benzylaminopurine (BAP) 2mg/l, IAA - 0.5mg/l.

Crupina vulgaris- callus culture

The *Crupina* genus plants species belonging to the Asteraceae family which contain secondary metabolic products with high biological activity are widely used in medicine, cosmetic and food industry. Plant materials from Asteraceae family might be bioactive secondary metabolites that have the potential to treat different afflictions. Examples of these compounds include phenols, phenolic glycosides, unsaturated lactones, sulfur compounds, saponins, cyanogenic glycosides and glucosinolates [7, 9]. A number of species are considered invasive. Different plants contain different bioactive compounds and these vary with area, climate and mode of agricultural practice if they are not present in wild environment. Herbivory, pathogens and competition are the driving forces that induce plant species to develop chemical defense compounds. These plant origin compounds are good models for elucidation of their functional roles in medication and treatment of different afflictions. Poisonous plants exposed to frequent grazing by animals are commonly rich in alkaloids which have many biological activities including anticancer potential [5]. However, the growth regulatory properties of some plant metabolites allow them to act as chemotherapeutical agents. Flavonoids from *Scutellaria baicalensis* act on cyclin-dependent kinases to inhibit cancer cell proliferation [1]. Members of the Asteraceae family produce a large number of various secondary metabolites that show biological activity. Among them, sesquiterpene lactones and flavonoids are the most interesting ones from the pharmacological point of view. These substances are known for their reported medical efficacy e.g. strong anti-inflammatory, antimalarial, antioxidant, antitumor activity, as well as for the fact that they increase immunity and decrease the risk of atherosclerosis, arthritis and gastrointestinal disorders [7]. In many cases, the α -methylene group in the lactone ring of sesquiterpene lactones, being potentially able to bind the nucleophile sites of biomolecules by conjugate addition, manifests their biological activity [4].

The genus *Crupina* comprises three species: *vulgaris*, *crupinastrum*, and *intermedia*. Ranges of *C. vulgaris* and *C. crupinastrum* overlap in Spain, Italy, Greece, and Turkey, although in each case, *C. vulgaris* grows on more northern or more mesic sites than *C. crupinastrum* [2]. The range of *C. vulgaris* extends northward to the dry valleys of the Alps in Switzerland, France and Italy, where it is restricted to open grasslands on steep south-facing slopes [10].

C. vulgaris normally grows on calcareous loam or clay loam soils of limestone parent material, and is rarely found, usually as an accidental introduction, on sandy soils or over siliceous (acidic) parent material [3].

Material and methods

Plant material. The investigated plant *C. vulgaris* Cass. was collected from Aragatsotn region (Mughni) in Armenia (1500-1600 m above sea level, N 40° 22.085', E 44° 22.815') during the flowering period.

Obtaining of isolated cultures. The leaves and stems were used as explants. To isolate tissue cultures the explants (approx. diameters of explants - 0.8 to 1.2 cm) were sterilized with solution of 330 mg/L mercuric chloride and 660 mg/L cetylpyridinium chloride for 8-10 min followed by four rinses with sterile distilled water. The sterilized explants were individually aseptically placed into petri dishes, containing 20 mL Murashige and Skoog (MS) nutrient medium [6], supplemented with 2.0 mg/L indole 3 acetic acid (IAA), 0.2 mg/L kinetin, 0.1 g/L myo-inositol, 0.1 mg/L thiamine HCl, 0.5 mg/L pyridoxine HCl, 0.5 mg/L nicotinic acid, 2.0 mg/L amino acetic acid, 30 g/L sucrose and 8 g/L agar. The explants were placed in thermostat at 25°C (for the initiation of proliferation processes). Afterwards the formed primary callus tissues were placed in the flasks (50 mL) then replaced to the thermostat (in the same conditions).

To optimize medium composition for shoot multiplication, *in vitro* cultivation was performed in MS basal medium (including vitamins, sucrose and agar), supplemented with BAP-2mg/l, IAA-0.5 mg/l. This medium was conditionally named MR₃₀. Both of media were adjusted to pH 5.8 with 0.1 M NaOH before autoclaving for 20 min at 121°C. The cultures were placed in growth chamber at 25°C and illuminated with a 16-h photoperiod (natural daylight, supplemented with artificial light (approx. 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) provided by a white fluorescent lamp (Philips Inc., 36 W). Callus tissue further stable growth was supported in both MR₃₀ medium. *In vitro* micro-propagation of *C. vulgaris* was carried out using modified variant of nutrient medium.

Results and discussion

The leaves and stems were used as explants in this investigation. Callus formation was occurred only on the explants of leaf origin. The proliferation begins on 7-8th days on MS medium and the primary callus was formed on 18-20th days of cultivation. On the MS medium *C. vulgaris* callus culture has darker color and growth was generally directed over the surface of the agar medium (Fig. 1a), whereas the growth on MR₃₀ medium callus tissue was directed upward. Callus tissue of *C. vulgaris* had granular consistency and light yellow color growing in dark conditions (Fig.1b).

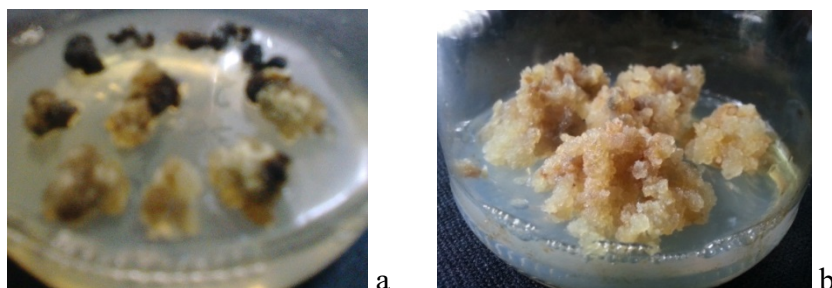


Fig. 1. Callus cultures of *C. vulgaris*, growing on MS medium (a), growing on MR₃₀ medium (b).

After several passages light color of callus culture has changed into a light brown with patches of white meristematic zones. Such tissue undergoes spontaneous organogenesis under the light (Fig. 2).



Fig. 2. Organogenesis of *C. vulgaris* on the MR₃₀ medium.

On the same nutrient medium root formation occurs. The leaves and roots of *C. vulgaris* regenerated plants were placed on the MR₃₀ fresh nutrient medium and callus culture was formed in these conditions.

Generally, the growth cycle of calli was ended on the 27-28th day, but in case with *in vitro* plantlets – on the 35-40th day of cultivation.

Conclusions

Summarizing data of our investigation might be possible to conclude that isolated culture of *C. vulgaris* can be obtained using MS medium modified variant in which the concentration of different auxins is prevalent on the cytokinin concentration of more than 7 fold.

Previous studies unveiled the high metabolic activity of isolated cultures of different plants growing in Armenia [8, 11, 12]. The metabolic activity of *C. vulgaris* on *in vitro* cultures is not reported. Since both *in vitro* cultures and intact plants of *C. vulgaris* have intensive growth rate, they can be used as model systems in biotechnological investigations to produce valuable metabolites.

References

1. Dai Y, Grant S, 2003. Cyclin-dependent kinase inhibitors. Current Opinion in Pharmacology, 3:362-370.
2. Gamarra R, Roché CT, 2002. Distribution of the genus *Crupina* in the Iberian Peninsula and the Balearic Islands. Madrono, 49:137-142.
3. Garnatje T, Vilatersana R, Roché CT, Garcia-Jacas N, Susanna A, Thill DC, 2002. Multiple introductions from the Iberian Peninsula are responsible for invasion of *Crupina vulgaris* in western North America. New Phytologist, 154:419-428.
4. Hasan S, Sobhian R, Knutson L, 1999. Preliminary studies on *Ramularia crupinae* sp. nov. as a potential biological control agent for common crupina (*Crupina vulgaris*) in the USA. Annals of Applied Biology, 135:489-494.
5. Kintzios E, 2006. Terrestrial plant-derived anticancer agents and plant species used in anticancer research. Critical Reviews in Plant Science, 25:79-113.
6. Murashige T, Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays. Physiologia Plantarum, 15:473-479.
7. Mukherjee A, Basu S, Sarkar N, Ghosh A, 2001. Advances in cancer therapy with plant based natural products. Current Medicinal Chemistry, 8:1467-1486

8. Petrosyan MT, Shcherbakova YN, Popov YuG, Trchounian AH, 2013. Isolated culture of St.-John's wort elongated (*Hypericum elongatum* Ledeb.) as the source of biologically active compounds. Reports of National Academy of Sciences of Armenia, 113:195-201.
9. Quiroga E, Sampietro A, Vattuone A, 2001. Screening antifungal activities of selected medicinal plants, Journal of Ethnopharmacology, 74:89-96.
10. Roché CT, Thill DC, 2001. Biology of common crupina and yellow starthistle, two Mediterranean winter annual invaders in western North America. Weed Science, 49:439-447.
11. Sahakyan NZh, Petrosyan MT, Popov YuG, Volodin VV, Matistov NV, Gruzdev IV, Shirshova TI, 2010. Content of neutral lipids and fatty acids in callus cultures and leaves of intact plants of *Ajuga genevensis* and *Ajuga chia*. Second Balkan Conference on Biology, Special edition, p. 87- 90.
12. Sahakyan NZh, Petrosyan MT, Volodin VV, Volodina SO, Agajanyan JA, Popov YuG, 2008. Isolated culture of *Ajuga genevensis* L. as a potential source of biological active substances. The New Armenian Medical Journal, 2:65-74.

Biol. Journal of Armenia, 1 (69), 2017

THE STUDY OF THE CHANGES IN ACTIVITY OF SOD IN PATHOPHYSIOLOGY OF GASTRIC CANCER DEPENDING ON THE STAGE OF DISEASE

**H.H.ZAKARYAN, F.P. SARUKHANYAN, G.A. HOVHANNISYAN,
N.H. BARKHUDARYAN**

*H. Buniatian Institute of Biochemistry NAS, RA, Yerevan, Armenia
zhhermine83@mail.ru*

Superoxide dismutase (SOD) is an antioxidant enzyme that plays an important role in the defense system of the body. The aim of this study was to investigate the changes in activity of superoxide dismutase (SOD) in the plasma and tumor tissue of patients with gastric cancer depending on the stage (I-IV) of disease. It has been shown that SOD activity in the plasma of gastric cancer patients is significantly reduced compared with SOD activity in the plasma of healthy donors. In the same time tumor tissue SOD activity is increased compared with healthy (histologically examined) control tissue. The results obtained indicated that changes of SOD activity in plasma and tumor tissue of gastric cancer patients depend on the stage of disease.

Gastric cancer - superoxide dismutase - reactive oxygen species

Սուպերօքսիդիզիսմուտազը (ՍՕԴ) հակաօքսիդանտային ֆերմենտ է, որը կարևոր դեր է խաղում օրգանիզմի պաշտպանողական համակարգում: Այս հետազոտության նպատակն էր ուսումնասիրել ՍՕԴ-ի ակտիվության փոփոխությունը ստամոքսի քաղցկեղով հիվանդների արյան պլազմայում և ուռուցքային հյուսվածքում կախված հիվանդության զարգացման փուլից (I-IV): Ցույց է տրվել, որ ստամոքսի քաղցկեղով հիվանդների արյան պլազմայում ՍՕԴ-ի ակտիվությունը նշանակալիորեն նվազում է առողջ դոնորների արյան պլազմայում ՍՕԴ-ի ակտիվության համեմատ: Միևնույն ժամանակ, ուռուցքային հյուսվածքում ՍՕԴ-ի ակտիվությունն աճում է առողջ (հյուսվածաբանորեն զննված) ստուգիչ հյուսվածքում ՍՕԴ-ի ակտիվության համեմատ: Ստացված տվյալները ցույց են տալիս, որ ստամոքսի քաղցկեղով հիվանդների պլազմայում և ուռուցքային հյուսվածքում ՍՕԴ-ի ակտիվության փոփոխությունը կախված է հիվանդության փուլից:

Ստամոքսի քաղցկեղ – սուպերօքսիդիզիսմուտազ – թթվածնի ակտիվ ձևեր

Супероксиддисмутаза (СОД) - антиоксидантный фермент, который играет важную роль в системе защиты организма. Целью данной работы было исследование изменений активности супероксиддисмутазы (СОД) в плазме и опухолевой ткани пациентов с раком желудка в

зависимости от стадии (I-IV) заболевания. Было показано, что активность СОД в плазме пациентов с раком желудка значительно снижается по сравнению с активностью СОД в плазме здоровых доноров. В то же время, в опухолевой ткани активность СОД возрастает по сравнению с активностью фермента в здоровой (гистологически исследованной), контрольной ткани. Полученные результаты показали, что изменения активности СОД в плазме и ткани пациентов с раком желудка зависят от стадии заболевания.

Рак желудка – супероксиддисмутаза – реактивные формы кислорода

Gastric carcinoma (GC) is one of the most common neoplasms in the world. The pathogenesis of GC is not completely understood. Nutritional, microbial, and genetic factors acting in a multistep and multifactorial process have been proposed [5]. Oxidant/antioxidant balance has been suggested as an important factor for initiation and progression of cancer, because reactive oxygen species (ROS) and changes in the cellular redox state activate multiple signaling pathways, participate in the regulation of cell growth and death, and induce the synthesis of proteins regulating cell protection in both nonmalignant and malignant cells [8]. Oxidative stress produced by the imbalance between ROS and biological antioxidant system can damage cellular macromolecules, leading to DNA and protein modification and lipid peroxidation [4].

SOD is a key antioxidant enzyme, scavenging the superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$), which is a precursor molecule for all other reactive oxygen species and their derivatives and can either promote or suppress tumor formation in human gastric mucosa. It has been found out that Ca^{2+} /calmodulin (CaM)-dependent protein phosphatase calcineurin (CN), which is key enzyme leading to the activation of the immune system by participating in synthesis of several cytokines via dephosphorylation and activation of NFAT (nuclear factor of activated T cells) transcription factors, is sensitive to oxidative stress and may be modulated by the intracellular redox potential [10]. CN was reported to be a partner of both SOD1 (Cu,Zn-SOD) and mitochondrial SOD2 (Mn-SOD) [11]. Recently, in our laboratory it has been shown, that activity of CN has been changed differently in the pathophysiology of gastric cancer depending on the stage of disease [9]. Considering above mentioned and the controversial literature data concerning the changes in SOD activity in pathophysiology of cancer [6, 13], the aim of this study was to detect the changes of SOD activity in plasma and tumor tissue of patients with gastric adenocarcinoma in all (I-IV) stages of disease.

Materials and methods. Studies were conducted on a group of 30 patients with gastric adenocarcinoma, including males and females, mean age 62 years, who underwent radical gastrectomy for gastric cancer at the National Center of Oncology after V.A. Fanarjyan (Ministry of Healthcare, RA). Patients were not treated by radio- or chemotherapy before surgery. The plasma of healthy donors (n=6) and histologically checked healthy parts of remote tissue were used as a control.

Blood samples (3ml) were collected into sodium citrate (3,2%)-coated vacutainer tubes and plasma was separated by centrifugation at 1500 rpm for 10 min. Tissue samples (1-2g) were homogenized in 5 volumes of 50 mM Tris/HCl buffer (pH 7,5) containing 0,05% Triton-X-100, 0,1 mM EDTA and 1 mM dithiothreitol (DTT) and protease inhibitors. Supernatants were obtained by centrifugation at 10000×g for 60min at 4°C. Supernatants and plasma samples were stored at -70°C until determination. Protein content in samples was determined by Bradford assay.

The activity of SOD was measured spectrophotometrically using Agilent Cary 60 UV-VIS spectrophotometer by the method of Sirota [1].

Data were analyzed statistically by one-way ANOVA using Origin 61 software. Statistical significance – $p < 0,05$. All data were expressed as mean±SEM.

Results and discussion. Results obtained have been demonstrated that in plasma of

gastric cancer patients SOD activity was shown to be decreased in the I, II, III and IV stages by 68.5%, 75.5%, 78.3% and 80.4%, respectively, compared with control (Fig. 1a).

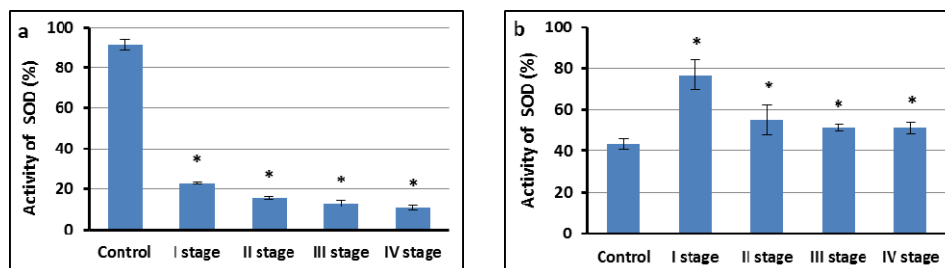


Fig. 1. SOD activity in the plasma of healthy donors and gastric cancer patients in different stages of disease (a), and SOD activity in healthy control tissue, as well as in tumor tissue in different stages of disease (b).

* $p < 0.05$ for the I stage ($n=6$) compared with control ($n=6$) and for the II ($n=8$), III ($n=8$), and IV ($n=8$) stages compared with the I stage.

As shown in Fig. 1b, the activity of SOD was considerably higher in tumor tissue compared with the activity in healthy control. SOD activity was shown to be increased in the I, II, III and IV stages by 33.5%, 11.6%, 7.6% and 7.58, respectively, compared with control.

Our data obtained have been indicated that the activity of SOD is changed differently in plasma and tumor tissue of gastric cancer patients among the subsequent stages of GC development. Reduction of plasma SOD activity depending on the stage of GC may be due to an increased endogenous production of ROS in plasma of gastric cancer patients, which rises from I-IV stage [2]. It is well known that gastrointestinal tract is a key source of ROS, which production has been shown to increase in the gastric mucosa of persons infected with *Helicobacter pylori*, but a large amount of ROS was generated in response to an active inflammatory reaction in the stomach, even among those without *Helicobacter pylori* infection [15]. Despite of the protective barrier provided by the epithelial layer, ingested materials and pathogens can cause inflammation by activating the epithelium, polymorphonuclear neutrophils (PMNs), and macrophages to produce inflammatory cytokines and other mediators that contribute further to oxidative stress and elevated level of ROS [14].

Extensive research during the last quarter century has revealed that reactive oxygen species produced in the body, primarily by the mitochondria, play a major role in various cell-signaling pathways, by activating various transcription factors (e.g., nuclear factor kappa B (NF- κ B), activator protein-1, hypoxia-inducible factor-1a, and signal transducer and activator of transcription 3), which have been shown to play an important roles in regulating of constitutive or inductive expression levels of SOD [7].

Paradoxically, ROS also control the expression of various tumor suppressor genes (p53, Rb, and PTEN). Similarly, c-radiation and various chemotherapeutic agents used to treat cancer mediate their effects through the production of ROS, to destroy malignant cells by inducing apoptosis. Interestingly, ROS have also been implicated in the chemopreventive and anti-tumor action of nutraceuticals derived from fruits, vegetables, spices, and other natural products used in traditional medicine [3].

Considering the fact that many human tumors have been shown to express high levels of SOD, which has been associated with aggressive tumor characteristics [12] and our data, we think that up-regulation of SOD activity in gastric carcinoma tissue most likely serves as a protective mechanism against superoxide radicals for cancer cells and targeting SOD may be a promising approach for the selective killing of cancer.

Acknowledgment. We thank to NCO after V.A. Fanarjyan (MOH RA), particularly the Laboratory of Clinical Pathomorphology, for provided oncological samples.

References

1. *Cupota T. B.* Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использование его для измерения активности супероксиддисмутазы. *Вопр. мед. Химии*, 45(3):263-272, 1999.
2. *Bakan E., Taysi S., Polat M., Dalga S., Umudum Z., Bakan N., Gumus M.* Nitric oxide levels and lipid peroxidation in plasma of patients with gastric cancer. *Jpn J Clin Oncol* 32 (5): 162-166, 2002.
3. *Bhattacharyya A., Chattopadhyay R., Mitra S. and Sheila E.* Oxidative stress: An Essential Factor in the Pathogenesis of Gastrointestinal Mucosal Diseases. *Physiol Rev*, 94:329-354, 2014.
4. *Chang D., Wang F., Zhao Y. and Pan H.* Evaluation of oxidative stress in colorectal cancer patients. *Biomedical and Environmental Sciences*, 21(4):286-289, 2008.
5. *Correa P.* A new paradigm for human gastric carcinogenesis. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 30:381-385, 2000.
6. *Kocot J., Kielczykowska M., Dabrowski W., Pilat J., Rudzki S., Musik I.* Total antioxidant status value and superoxide dismutase activity in human colorectal cancer tissue depending on the stage of the disease: a pilot study. *Adv Clin Exp Med*, 22(3):431-437, 2013.
7. *Miao Lu and Daret K. Clair St.* Regulation of Superoxide Dismutase Genes: Implications in Diseases. *Free Rad Biol Med*, 47(4):344-356, 2009.
8. *Monari M., Trincherio A., Calabrese C., Sattani O., Serrazanetti G.P., Foschi J., Fabbri A., Zahlane D., Di Febo G., Tonini V., Cervellera M.* Superoxide dismutase in gastric adenocarcinoma; is it a clinical biomarker in the development of cancer?. *Biomarkers*, 11(6):574-584, 2006.
9. *Sarukhanyan F., Hunanyan O., Hovhannisyan G., Karapetyan A., Zakaryan H., Barkhudaryan N.* The regulation of calcineurin activity in the pathophysiology of cancer is organ specific and depends on the stage of disease. In abs. book of the 16th international conference of biochemistry and molecular biology "Signalling pathways in development, disease and aging", Vancouver, BC, Canada, p. 83-84, 2016.
10. *Sommer D., Fakata K. L., Swanson S. A., Stemmer P. M.* Modulation of the phosphatase activity by oxidants and antioxidants in vitro. *Eur. J. Biochem.*, 267(26): 2312-2322, 2000.
11. *Tokheim A. M., Martin B. L.* Association of calcineurin with mitochondrial proteins. *Proteins: structure, function and bioinformatics*, 64:28-33, 2006.
12. *Vuokko L. Kinnula and James D.* Crapo Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. *Free Radical Biology & Medicine*, 36(6):718-744, 2004.
13. *Yasuda M., Takesue F., Inutsuka S., Honda M., Nozoe T., Korenaga D.* Prognostic significance of serum superoxide dismutase activity in patients with gastric cancer. *Gastric Cancer* 5:148-153, 2002.
14. *Yongsheng Ma, Zhang Lin, Shengzhong Rong, Hongyan Qu, Yannan Zhang, Dong Chang, Hongzhi Pan and Wenbo Wang.* Relation between Gastric Cancer and Protein Oxidation, DNA Damage and Lipid Peroxidation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Volume 2013:543760, 2013.
15. *Zhang Q., Dawodu J., Etolhi G., Husain A., Gemmell C. and Russel, R.* Relationship between the mucosal production of reactive oxygen radicals and density of *Helicobacter pylori* in patients with duodenal ulcer. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 9:261-265, 1997.